



**TUGAS AKHIR - SB0141510**

# **KHAMIR DARI KAWASAN MANGROVE PANTAI TIMUR SURABAYA SEBAGAI PELARUT FOSFAT**

**WINDASARI PUTRI SEPTARINA  
1511 100 023**

**Dosen Pembimbing  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Jurusan Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**





**FINAL PROJECT - SB0141510**

# **YEAST FROM MANGROVE AREA OF SURABAYA EAST COAST AS A PHOSPHATE SOLUBILIZERS**

**WINDASARI PUTRI SEPTARINA  
1511 100 023**

**Advisor Lecturer  
Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si**

**Departement of Biology  
Faculty of Mathematics and Science  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember  
Surabaya 2015**



## LEMBAR PENGESAHAN

### KHAMIR DARI KAWASAN *MANGROVE* PANTAI TIMUR SURABAYA SEBAGAI PELARUT FOSFAT

#### TUGAS AKHIR

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat  
Memperoleh Gelar Sarjana Sains  
Pada

Jurusan S-1 Biologi  
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember

Oleh:

**WINDASARI PUTRI SEPTARINA**  
**NRP. 1511 100 023**

Disetujui oleh Pembimbing Tugas Akhir

Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. .... (Pembimbing)

Surabaya, 1 Juli 2015

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Biologi



Dr. rer. nat. Ir. Maya Shovitri, M.Si  
NIP. 19690907 199803 2 001

## KHAMIR DARI KAWASAN MANGROVE PANTAI TIMUR SURABAYA SEBAGAI PELARUT FOSFAT

**Nama** : Windasari Putri Septarina  
**NRP** : 1511 100 023  
**Jurusan** : Biologi  
**Dosen Pembimbing** : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

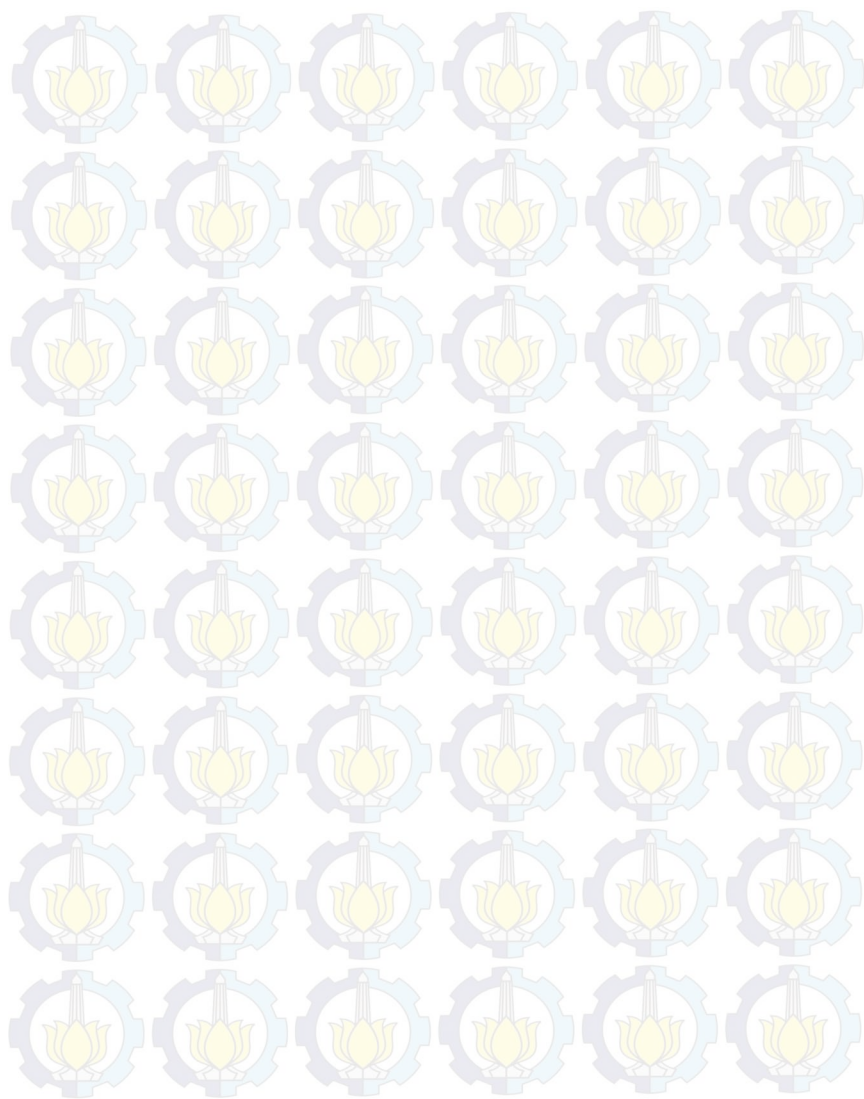
### Abstrak.

*Fosfor termasuk dalam unsur hara makro utama yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Ketersediaan fosfor terlarut yang sebagian besar berbentuk fosfat sangat terbatas. Penyediaan fosfat dengan bantuan khamir pelarut fosfat lebih efektif karena dilakukan dengan cara melarutkan kompleks fosfat baik anorganik maupun inorganik. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui indeks potensi pelarut fosfat terbaik dari isolat khamir, mengetahui kadar fosfat terlarut yang dihasilkan pada tiap waktu inkubasi berbeda dan mengetahui genus khamir apakah yang memiliki potensi terbaik sebagai pelarut fosfat.*

*Isolat khamir koleksi laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS Surabaya diuji secara kualitatif dan dua isolat terbaik hasil uji kualitatif kemudian diuji kuantitatif. Pengujian dilakukan dengan menggunakan medium Pikovskaya.*

*Dua isolat khamir yang memiliki nilai IPF tertinggi adalah isolat dengan kode W1.1 dan G3.2. Isolat W1.1 memiliki nilai IPF sebesar 1,18 dan isolat G3.2 memiliki nilai IPF sebesar 1,15. Khamir yang memiliki potensi terbaik sebagai pelarut fosfat diduga termasuk ke dalam genus Candida. Candida W1.1 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 0,50 ppm pada hari ke-7 dan Candida G3.2 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 0,77 ppm pada hari ke-7.*

*Kata kunci: khamir, pelarut fosfat, Pikovskaya.*





## YEAST FROM MANGROVE AREA OF SURABAYA EAST COAST AS A PHOSPHATE SOLUBILIZERS

**Student Name** : Windasari Putri Septarina  
**NRP** : 1511 100 023  
**Departement** : Biologi  
**Advisor Lecturer** : Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si.

### Abstract.

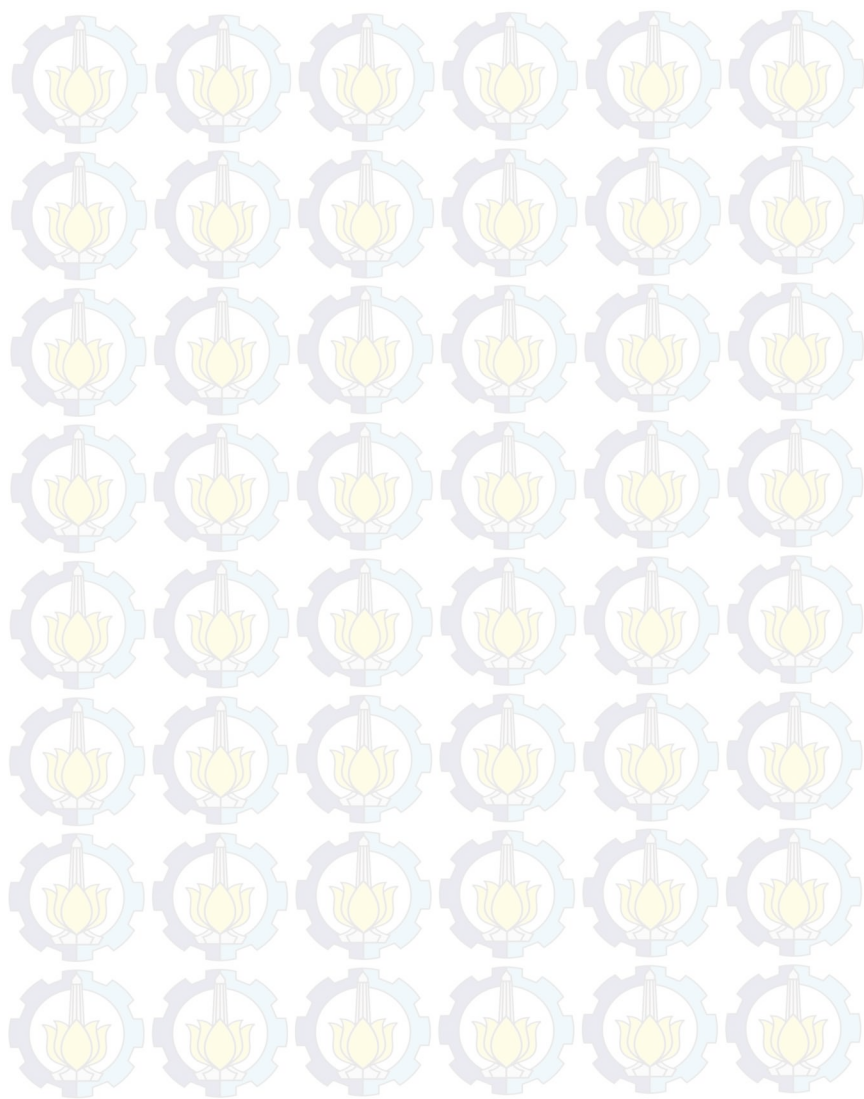
Phosphorus is the main macro nutrients required for plant growth and development. The availability of soluble phosphorus that mostly in form of phosphate is very limited. The availability of phosphate by phosphate solubilizing yeast is more effective because it can dissolve phosphate complex include organic and inorganic phosphate. The purpose of this research is to obtain the best potential phosphate solubilization index of yeast, to obtain concentration of soluble phosphate produced at each different incubation times and to know which yeast's genus that is the most potential as a phosphate solubilizers.

Yeast isolates is collection of Laboratory of Microbiology and Biotechnology, Biology ITS Surabaya. It was tested qualitatively and the best result of two isolates from qualitative test then tested quantitatively. The test used Pikovskaya medium.

Two yeast isolates with the highest IPF value are W1.1 and G3.2. The IPF value of W1.1 is 1,18 and the IPF value of G3.2 is 1,15. Yeast that have the most ability to solubilize phosphate expected from genus *Candida*. *Candida* W1.1 produce soluble phosphate in concentration of 0,50 ppm at the 7th day and *Candida* G3.2 produce soluble phosphate in concentration of 0,77 ppm at the 7th day.

**Keywords:** yeast, phosphate solubilizers, Pikovskaya.





## KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum wr. wb.

Puji syukur penulis panjatkan atas limpahan karunia dan rahmat dari Allah SWT, atas kemudahan dan kelancaran dalam penulisan dan penyusunan Tugas Akhir yang berjudul **Khamir dari Kawasan *Mangrove* Pantai Timur Surabaya sebagai Pelarut Fosfat**. Proses penyusunan Tugas Akhir ini tidak terlepas dari dorongan dan bimbingan dari pihak-pihak terkait, sehingga kendala yang muncul dapat dihadapi dan diselesaikan. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak dan Ibu penulis, yang selalu memberikan dukungan dan curahan kasih sayang yang tak pernah reda. Terucap pula terima kasih kepada Ibu Nur Hidayatul Alami, S.Si., M.Si. selaku dosen pembimbing yang selalu memberikan bimbingan, saran dan dukungan kepada penulis selama penyusunan Tugas Akhir. Tak lupa penulis mengucapkan terima kasih kepada Ir. Sri Nurhatika, M.P selaku dosen penguji satu dan Dr. Enny Zulaikha, M.P selaku dosen penguji dua yang telah memberikan kritik dan saran yang membangun kepada penulis demi terciptanya kesempurnaan Tugas Akhir ini.

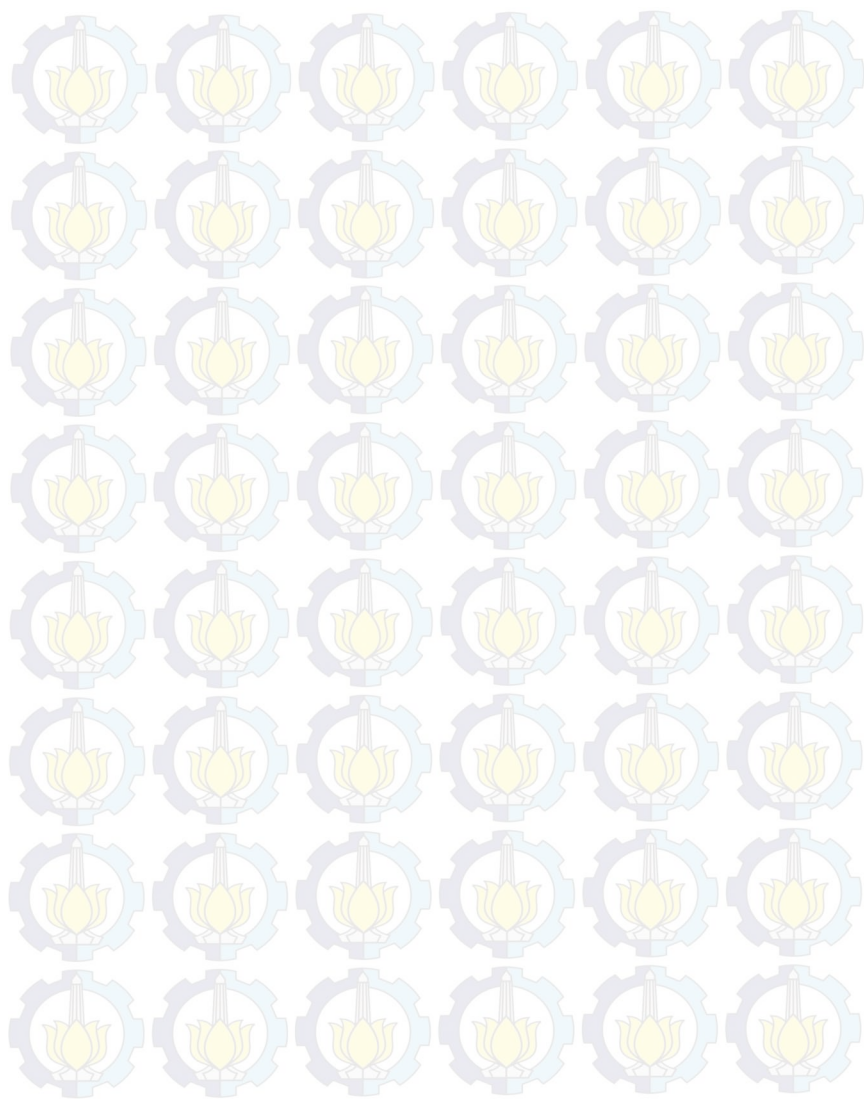
Ucapan terima kasih kembali penulis sampaikan kepada kakak, juga teman-teman Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, yang telah memberikan dukungan yang sangat berarti. Serta pihak-pihak lain yang telah membantu secara langsung maupun tersirat dalam penyelesaian proposal ini.

Penulis menyadari bahwa penulisan Tugas Akhir ini masih jauh dari ideal. Saran dan kritik membangun akan sangat berarti bagi penulis. Penulis berharap Tugas Akhir ini dapat memberikan manfaat kepada para pembacanya.

Wassalamu'alaikum wr. wb.

Surabaya, 29 Juni 2015

Windasari Putri Septarina



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL (INDONESIA) .....	i
HALAMAN JUDUL (ENGLISH) .....	iii
LEMBAR PENGESAHAN .....	v
ABSTRAK .....	vii
ABSTRACT .....	ix
KATA PENGANTAR .....	xi
DAFTAR ISI .....	xiii
DAFTAR TABEL .....	xv
DAFTAR GAMBAR .....	xvii
DAFTAR LAMPIRAN .....	xix
<b>BAB I PENDAHULUAN</b>	
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Permasalahan .....	3
1.3 Batasan Masalah .....	3
1.4 Tujuan.....	4
1.5 Manfaat .....	4
<b>BAB II TINJAUAN PUSTAKA</b>	
2.1 Kawasan Pantai Timur Surabaya .....	5
2.2 Khamir .....	6
2.3 Fosfat .....	10
2.4 Khamir Pelarut Fosfat .....	12
2.5 Pelarutan Fosfat .....	13
2.5.1 Enzim pelarut fosfat .....	13
2.5.2 Asam organik .....	15
<b>BAB III METODOLOGI</b>	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian .....	17
3.2 Metode yang Digunakan .....	17
3.2.1 Isolat khamir yang digunakan .....	17
3.2.2 Subkultur isolat khamir .....	17
3.2.3 Karakterisasi khamir .....	18
3.2.4 Pembuatan medium selektif Pikovskaya .....	18



3.2.5 Uji potensi isolat khamir sebagai pelarut fosfat .....	19
3.2.6 Identifikasi khamir pelarut fosfat .....	19
3.2.7 Uji fisiologis .....	20
3.2.8 Persiapan uji pelarutan fosfat secara kuantitatif .....	21
3.2.9 Uji pelarutan fosfat oleh khamir secara kuantitatif .....	22
3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data .....	23

#### **BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN**

4.1 Karakterisasi Khamir .....	25
4.2 Potensi Isolat Khamir sebagai Pelarut Fosfat .....	30
4.3 Identifikasi Khamir Pelarut Fosfat .....	33
4.4 Kurva Standart Fosfat .....	39
4.5 Konsentrasi Fosfat Terlarut yang Dihasilkan Isolat Khamir .....	40

#### **BAB V KESIMPULAN DAN SARAN**

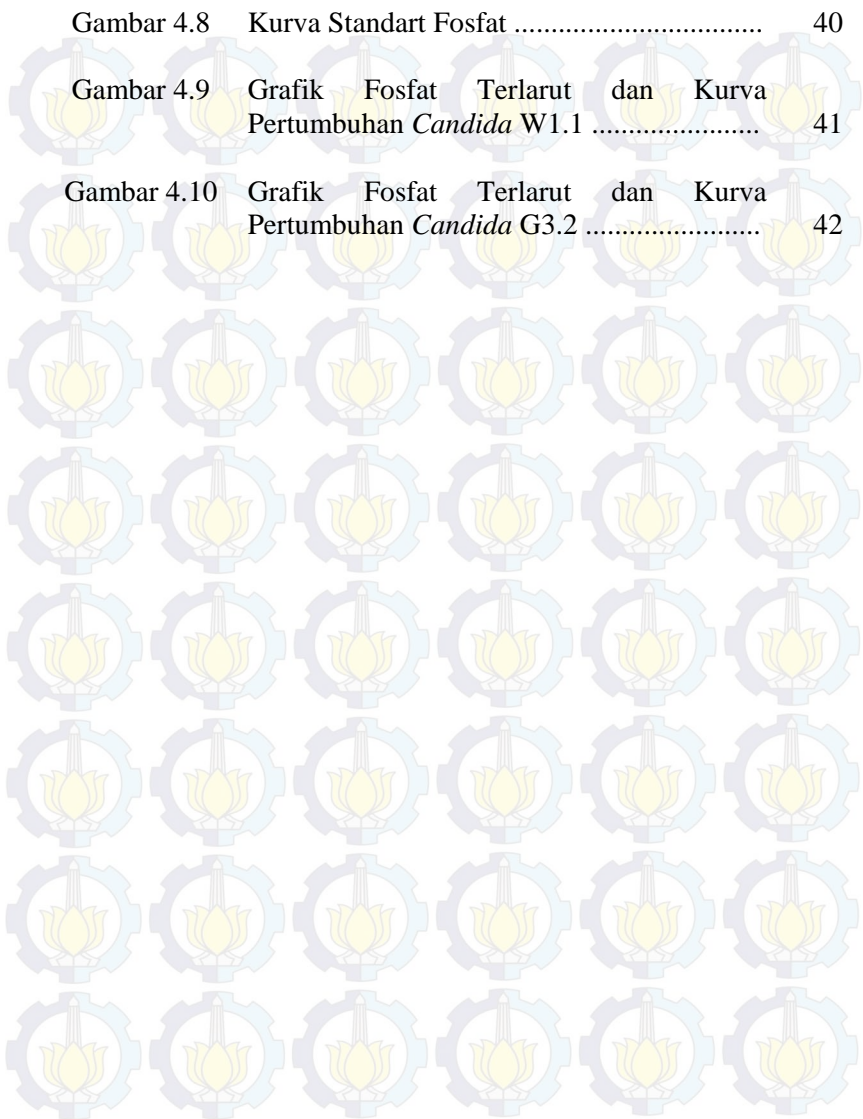
5.1 Kesimpulan .....	47
5.2 Saran .....	47

DAFTAR PUSTAKA .....	49
LAMPIRAN .....	57

## DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 2.1 Karakter Makroskopis Khamir .....	7
Gambar 2.2 Bentuk Sel Khamir .....	8
Gambar 2.3 Sel Khamir dengan Pewarnaan Sederhana Menggunakan <i>Methylene Blue</i> .....	8
Gambar 2.4 Tipe <i>Budding</i> Sel Khamir .....	9
Gambar 2.5 Skema Pelepasan Fosfat melalui Proses Khelat .....	16
Gambar 3.1 Rumus Perhitungan Indeks Pelarutan Fosfat .....	19
Gambar 4.1 Karakterisasi Makroskopis Isolat W1.1 dengan Metode <i>Streak Continue</i> .....	25
Gambar 4.2 Dua Isolat Terbaik Hasil Uji Kualitatif .....	31
Gambar 4.3 Grafik Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) pada Akhir Waktu Inkubasi .....	32
Gambar 4.4 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat W1.1 .....	33
Gambar 4.5 Hasil Uji Fisiologis Isolat W1.1 .....	34
Gambar 4.6 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat G3.2 .....	36
Gambar 4.7 Hasil Uji Fisiologis Isolat G3.2 .....	37

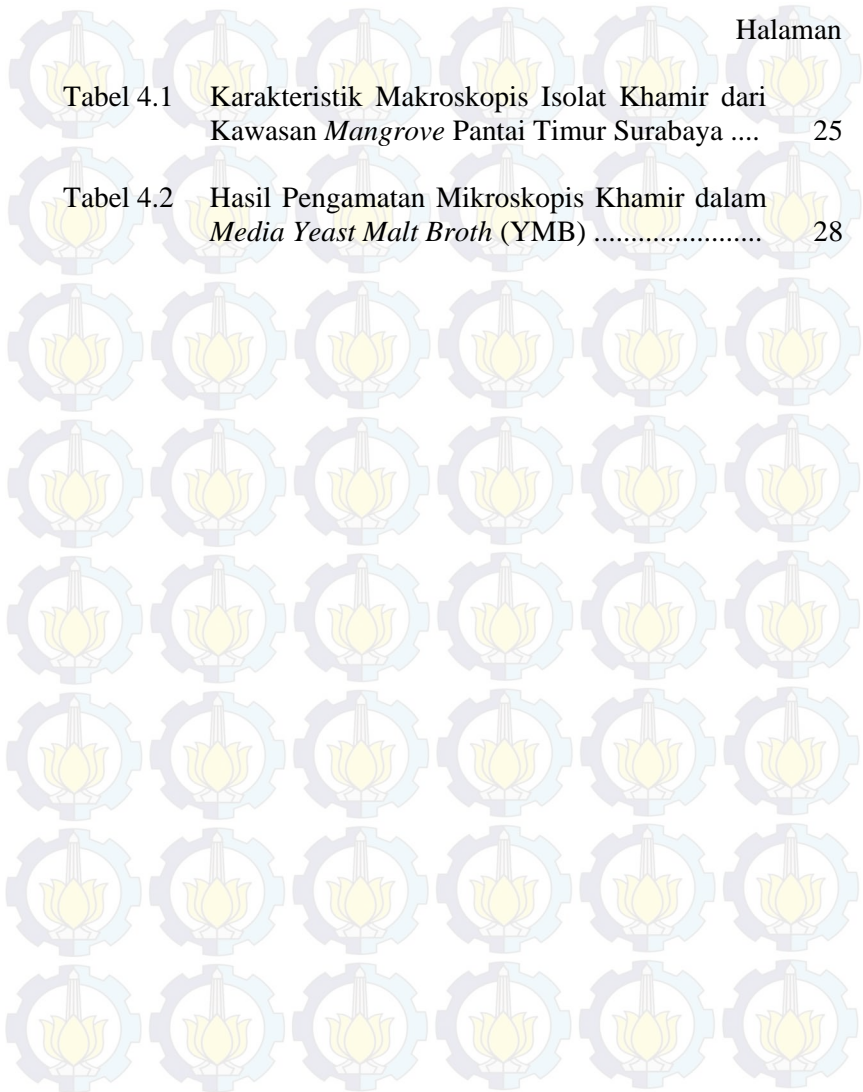
Gambar 4.8	Kurva Standart Fosfat .....	40
Gambar 4.9	Grafik Fosfat Terlarut dan Kurva Pertumbuhan <i>Candida</i> W1.1 .....	41
Gambar 4.10	Grafik Fosfat Terlarut dan Kurva Pertumbuhan <i>Candida</i> G3.2 .....	42

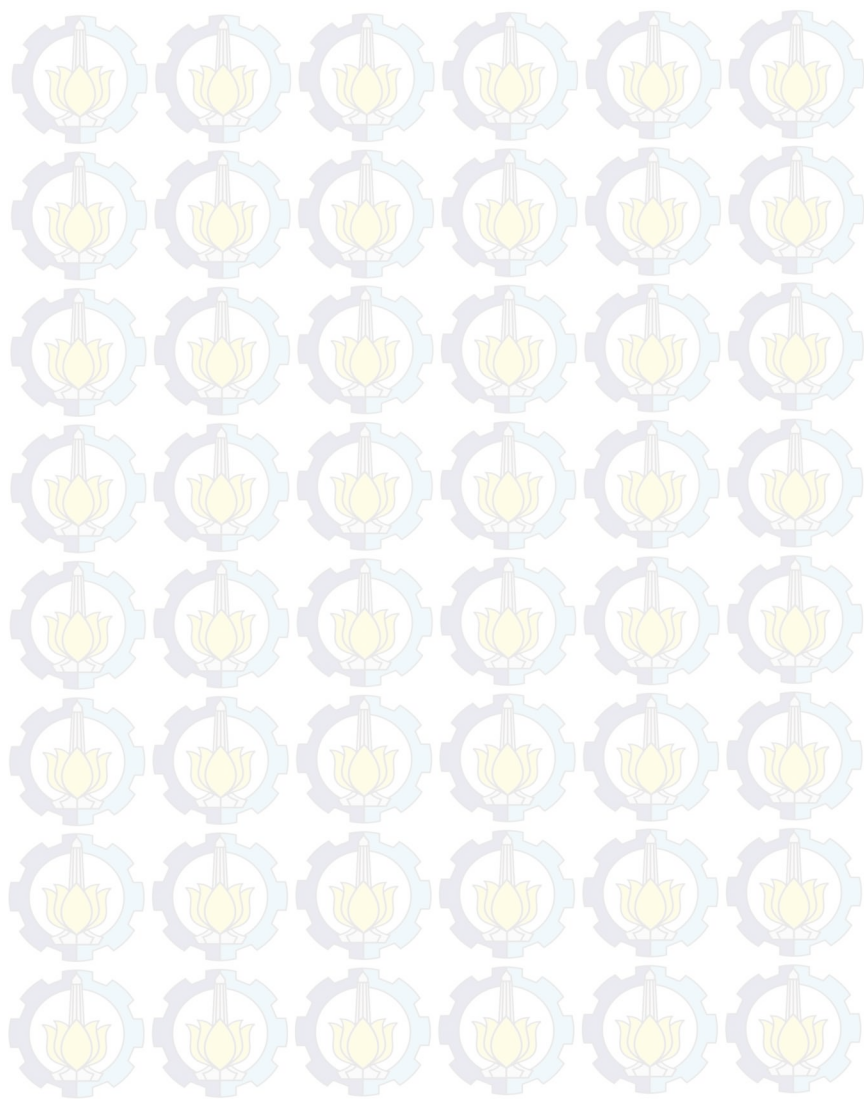




## DAFTAR TABEL

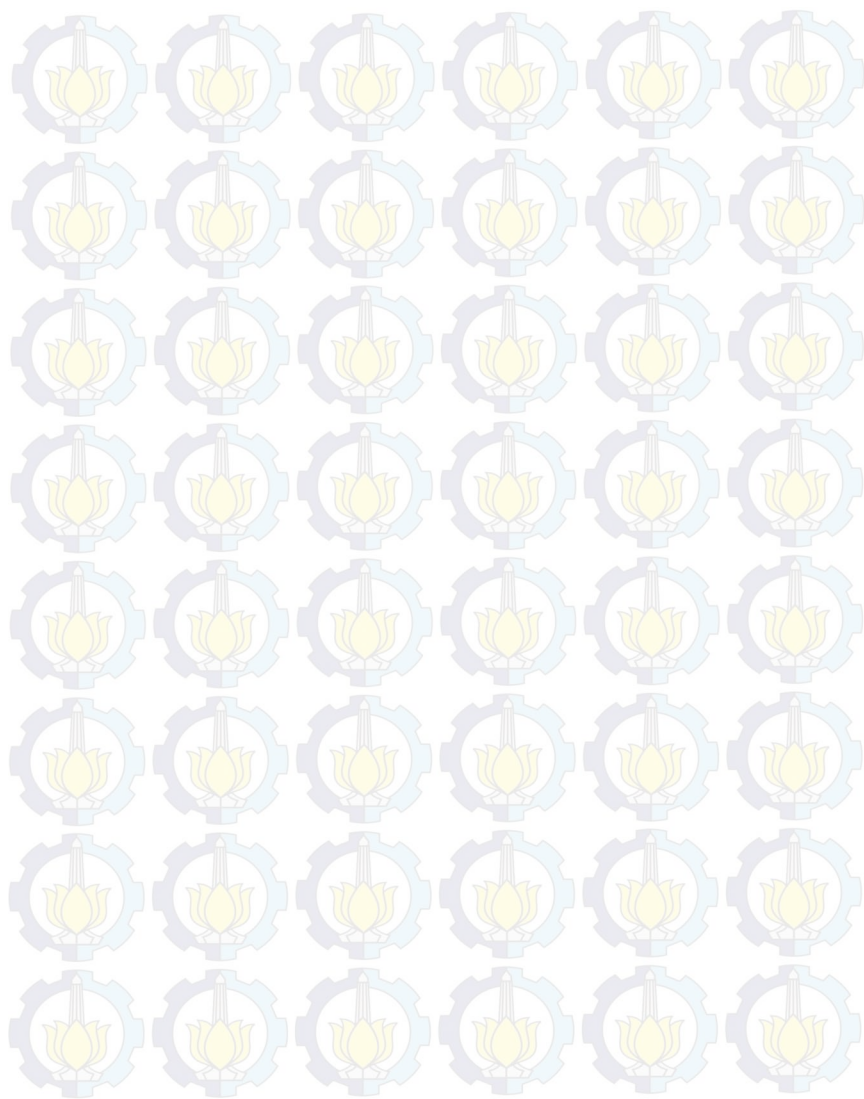
	Halaman
Tabel 4.1 Karakteristik Makroskopis Isolat Khamir dari Kawasan <i>Mangrove</i> Pantai Timur Surabaya ....	25
Tabel 4.2 Hasil Pengamatan Mikroskopis Khamir dalam <i>Media Yeast Malt Broth</i> (YMB) .....	28





## DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1: Pembuatan Medium YMEA ( <i>Yeast Malt Extract Agar</i> ) dan YMB ( <i>Yeast Malt Broth</i> ) .....	57
Lampiran 2: Pembuatan Medium Uji Fermentasi Glukosa .....	58
Lampiran 3: Pembuatan dan Komposisi Medium <i>Urea Broth</i> .....	59
Lampiran 4: Pembuatan Medium <i>Corn Meal Agar</i> dan Metode <i>Slide Culture</i> .....	60
Lampiran 5: Hasil Uji Kualitatif Isolat Khamir .....	61
Lampiran 6: Rata-rata Diameter Koloni Khamir .....	63
Lampiran 7: Rata-rata Diameter Total Isolat Khamir .....	64
Lampiran 8: Lebar Zona Bening Isolat Khamir .....	65
Lampiran 9: Indeks Pelarutan Fosfat Isolat Khamir .....	66
Lampiran 10: Nilai Absorbansi Kurva Standart Fosfat .....	69
Lampiran 11: Konsentrasi Fosfat Terlarut .....	70
Lampiran 12: Jumlah Koloni Isolat Khamir .....	71



## **BAB I PENDAHULUAN**

### **1.1 Latar Belakang**

Fosfor termasuk dalam unsur hara makro utama selain nitrogen (Tisdale *et al.*, 1985). Sebagian besar fosfor terdapat di alam dalam bentuk fosfat (Clescerl *et al.*, 1999). Fosfat merupakan nutrisi esensial yang diperlukan oleh tanaman dalam proses pertumbuhan dan perkembangannya (Vassileva *et al.*, 1998). Fosfat di dalam tanah terdapat dalam bentuk fosfat anorganik dan fosfat organik (Sutedjo, 1996). Di alam, fosfat tersedia dalam konsentrasi rendah karena fosfat difiksasi membentuk kompleks fosfat besi, aluminium, dan kalsium yang tidak larut (Alam *et al.*, 2002).

Kekurangan fosfat merupakan faktor pembatas pertumbuhan yang utama untuk tanaman, sehingga penambahan pupuk kimia berfosfat dilakukan untuk mengoptimalkan hasil tanaman tersebut (Alam *et al.*, 2002). Adanya pengikatan-pengikatan fosfat tersebut menyebabkan pupuk fosfat yang diberikan tidak efisien, sehingga perlu diberikan dalam takaran tinggi. Pemberian pupuk fosfat ke dalam tanah, hanya 15-20% yang dapat diserap oleh tanaman. Sedangkan sisanya akan terserap di antara koloid tanah dan tinggal sebagai residu dalam tanah (Jones, 1982). Untuk mengurangi penumpukan unsur fosfat di tanah dan mengoptimalkan ketersediaan fosfat bagi tanaman tanpa meningkatkan pemberian pupuk, dapat digunakan agen hayati berupa mikroorganisme yang mampu melarutkan fosfat di tanah secara alami (Khan *et al.*, 2009). Beberapa mikroorganisme tanah memiliki kemampuan untuk mengubah bentuk fosfat tak larut menjadi fosfat tersedia (Chen *et al.*, 2006).

Mekanisme pelarutan fosfat oleh mikroorganisme belum sepenuhnya dipahami, namun dari beberapa penelitian menyatakan bahwa mekanisme utama yang banyak terjadi di tanah adalah sekresi enzim fosfatase untuk pelarutan (mineralisasi)



fosfat-organik dan asam organik untuk pelarutan fosfat-mineral (Rodriguez dan Fraga, 1999).

Mikroorganisme mampu menghasilkan asam organik dari metabolisme glukosa di dalam tanah (Bajpai dan Rao, 2012). Meningkatnya asam-asam organik tersebut diikuti dengan penurunan pH. Akibatnya akan terjadi pelarutan fosfat terikat, terutama yang terikat pada mineral kalsium (Alexander, 1977). Khamir merupakan salah satu mikroorganisme yang bermanfaat untuk pertumbuhan tanaman yaitu dengan cara meningkatkan ketersediaan fosfat di dalam tanah (Nakayan *et al.*, 2009). Kemampuan untuk melarutkan kalsium fosfat merupakan karakter fisiologi khamir yang paling dicari untuk menentukan peran ekologiannya di dalam ekosistem tanah (Kanti, 2005). Jumlah khamir yang berpotensi sebagai pelarut fosfat berjumlah sekitar  $10^4$  dari setiap gram tanah kering (Schinner *et al.*, 1996).

Khamir tersebar hampir di semua lingkungan perairan, seperti laut, estuaria, danau, dan sungai (Kutty dan Philip, 2008). Khamir berperan dalam berbagai proses ekologis yang penting di laut, terutama pada estuaria dan lingkungan di dekat pantai. Khamir berperan penting dalam dekomposisi dari substrat tumbuhan, siklus nutrien, biodegradasi minyak dan senyawa lainnya (Meyers *et al.*, 1967). Khamir dibagi menjadi kelompok obligat dan fakultatif. Khamir *obligate marine* merupakan khamir yang sejauh ini tidak pernah ditemukan dari manapun selain lingkungan laut, sedangkan khamir *facultative marine* dapat ditemukan pada habitat *terrestrial* (Kutty dan Philip, 2008). Dibandingkan dengan khamir yang berasal dari daerah *terrestrial* atau air tawar, studi tentang khamir dari perairan laut jarang ditemukan (Kenworthy *et al.*, 1989).

Khamir dari genera *Cryptococcus* (Kanti, 2006), *Saccharomyces*, *Hansenula*, *Klockera*, *Rhodotorula* dan *Debaryomyces* diketahui merupakan khamir pelarut fosfat dengan indeks pelarut fosfat sebesar (1,33-1,50) (Narsian *et al.*, 2010). *Yarrowia lipolytica* juga merupakan khamir yang memiliki kemampuan melarutkan fosfat (Vassileva *et al.*, 2000). Penelitian

lain menyebutkan bahwa, *Candida* mampu menggunakan glukosa dengan cepat dan mempunyai kemampuan melarutkan fosfat organik dan anorganik. Dengan kemampuan tersebut *Candida* mempunyai peran yang cukup penting dalam pelarutan fosfat tanah (Kanti, 2006). Selain itu khamir dari genera *Pichia* juga diketahui mampu melarutkan fosfat (Kanti, 2005).

Isolat khamir koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Biologi ITS yang diisolasi dari kawasan Pantai Timur Surabaya belum diketahui genus serta potensinya dalam melarutkan fosfat, sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai potensi isolat tersebut.

## **1.2 Rumusan Permasalahan**

Penelitian ini memiliki permasalahan yang dirumuskan sebagai berikut :

1. Berapakah indeks potensi pelarutan fosfat terbaik dari isolat khamir?
2. Genus khamir apakah yang memiliki potensi pelarut fosfat paling baik?
3. Berapakah kadar fosfat terlarut tertinggi yang dihasilkan?

## **1.3 Batasan Masalah**

Penelitian ini memiliki batasan terhadap permasalahan sebagai berikut :

1. Pengujian dilakukan dalam skala laboratorium.
2. Isolat khamir diuji dengan menggunakan medium selektif Pikovskaya.
3. Sumber fosfat yang digunakan adalah  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .
4. Kemampuan melarutkan fosfat secara kualitatif dilihat pada zona bening pada medium Pikovskaya padat, dan secara kuantitatif dilihat dari kelarutan fosfat yang diukur menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 880 nm.
5. Hanya dua isolat terbaik yang mampu melarutkan fosfat yang diidentifikasi hingga genus.



## 1.4 Tujuan

Penelitian ini memiliki tujuan sebagai berikut :

1. Mengetahui indeks potensi pelarutan fosfat terbaik dari isolat khamir.
2. Mengetahui genus khamir apakah yang memiliki potensi terbaik sebagai pelarut fosfat.
3. Mengatahui kadar fosfat terlarut tertinggi yang dihasilkan.

## 1.5 Manfaat

Manfaat penelitian adalah mendapatkan isolat khamir yang unggul dan mampu melarutkan fosfat, sehingga isolat tersebut dapat dikembangkan sebagai agensia biofertilizer.

## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Kawasan Pantai Timur Surabaya

Pantai Timur Surabaya (Pamurbaya) memiliki hutan *mangrove* seluas 1.180 Ha. Spesies pohon *mangrove* yang dominan tumbuh adalah jenis *Rhizophora* sp. (46%), *Sonneratia* sp. (32%) dan *Bruguiera* sp. (18%) (Arisandi, 2001). Wilayah Pantai Timur Surabaya (Pamurbaya), sebagian besar merupakan kawasan *mangrove*. *Mangrove* Pamurbaya merupakan salah satu ekosistem yang memiliki peran penting bagi Kota Surabaya, baik secara ekologi maupun ekonomi. Luas daerah *mangrove* Pantai Timur Surabaya antara lain meliputi Kelurahan Keputih memiliki luas *mangrove* seluas 96,91 Ha, Wonorejo memiliki luas *mangrove* seluas 153,54 Ha, Gunung Anyar Tambak seluas 73,86 Ha (Ghazali, 2015).

*Mangrove* merupakan habitat terpenting kedua untuk khamir laut (Ramanathan *et al.*, 2008 dalam Thatoi *et al.*, 2012). Bagian perakaran *mangrove* atau *rhizosphere mangrove* memiliki populasi mikroorganisme yang umumnya lebih melimpah dan beragam bila dibandingkan pada tanah yang bukan *rhizosphere* (Lynch, 1990 dalam Zunaidah dan Alami, 2014).

*Rhizosphere* merupakan daerah yang ideal untuk pertumbuhan mikroorganisme tanah yang umumnya didominasi oleh bakteri, *actinomycetes*, dan *fungi* (Wang *et al.*, 2007). *Rhizosphere* kaya akan eksudat yang dikeluarkan oleh tanaman melalui proses sekresi akar. Kandungan eksudat antara lain karbohidrat, asam amino, asam organik, enzim, dan senyawa-senyawa lain (Cheema *et al.*, 2008 dalam Widiastutik dan Alami, 2014).

Mikroorganisme termasuk khamir dapat memanfaatkan eksudat melalui proses dekomposisi. Dekomposisi eksudat oleh mikroorganisme menghasilkan energi dan senyawa prekursor. Senyawa prekursor ini dapat dimanfaatkan oleh mikroorganisme

dan tanaman (Kartasapoetra *et al.*, 1991 *dalam* Widiastutik dan Alami, 2014).

## 2.2 Khamir

Khamir merupakan organisme eukariota uniseluler yang secara taksonomi termasuk dalam kingdom Eumycota. Spesies-spesies khamir dapat ditemukan dalam filum Ascomycota maupun Basidiomycota (Boekhout dan Phaff, 2003 *dalam* Boekhout dan Robert, 2003).

Cendawan terdiri atas dua bentuk, yakni kapang dan khamir. Perbedaan utama keduanya adalah khamir bersel tunggal atau uniseluler sedangkan kapang bersel banyak atau multiseluler (Lay, 1994 *dalam* Ernanda, 2003). Sebagai sel tunggal, khamir tumbuh dan berkembang biak lebih cepat dibandingkan dengan kapang yang tumbuh dengan pembentukan filamen. Khamir juga lebih efektif dalam memecah komponen kimia dibandingkan dengan kapang karena mempunyai perbandingan luas permukaan dengan volume yang lebih besar (Fardiaz, 1992).

Khamir merupakan mikroorganisme heterotropik yang tidak berfilamen dan bereproduksi melalui pertunasan atau pembelahan sel. Bentuk koloni khamir seringkali mirip dengan bakteri (Pelczar, 1986 *dalam* Ernanda, 2003). Khamir mudah dibedakan dari bakteri karena ukurannya yang lebih besar dan morfologinya yang berbeda dengan bakteri (Fardiaz, 1992). Khamir sangat beragam ukurannya, berkisar antara 1 sampai 5  $\mu\text{m}$  lebarnya dan panjangnya 5 sampai 30  $\mu\text{m}$  atau lebih. Berbentuk oval, tetapi beberapa ada yang memanjang atau berbentuk bola. Setiap spesies mempunyai bentuk yang khas, namun sekalipun dalam biakan murni terdapat variasi yang khas dalam hal ukuran dan bentuk sel individu, tergantung pada umur dan lingkungannya (Pelczar, 1986).

Khamir juga berbeda dari ganggang karena tidak dapat melakukan proses fotosintesis, dan berbeda dari protozoa karena mempunyai dinding sel yang kuat (Fardiaz, 1992). Khamir tidak

dilengkapi flagelum atau organ organ penggerak lainnya (Pelczar, 1986).

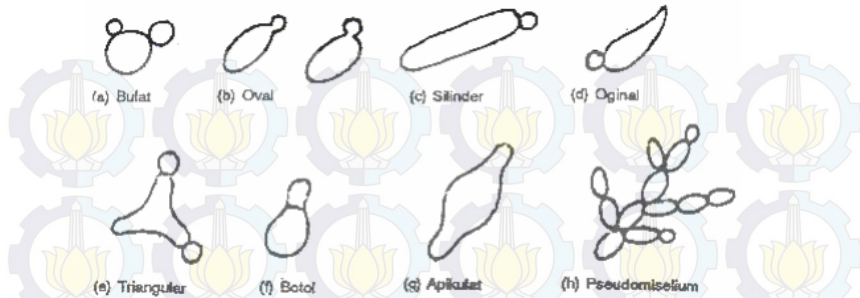
Pengamatan karakter makroskopis dilihat berdasarkan kenampakan koloni yang tumbuh pada medium padat (*Yeast Malt Ekstrakt Agar*), meliputi: tekstur koloni, warna koloni, tepi atau margin koloni, elevasi, permukaan koloni, dan ukuran koloni (Kurtzman dan Fell, 1998). Gambar karakter makroskopis khamir disajikan pada Gambar 2.1



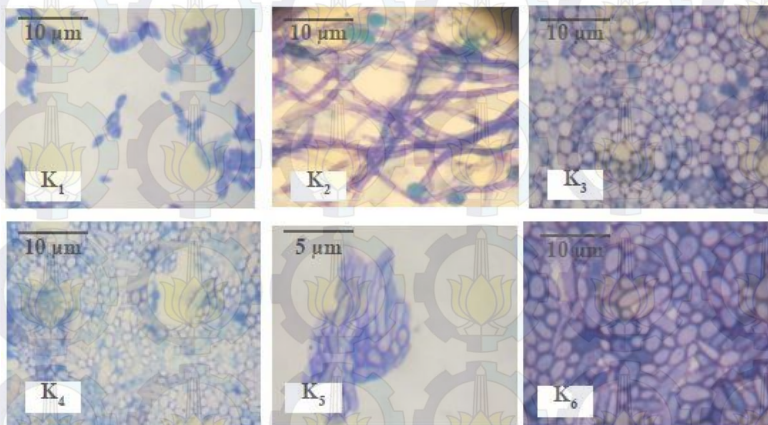
Gambar 2.1 Karakter Makroskopis Khamir (Anonim, 2014)

Tekstur koloni: *mucoïd*, *fluid* atau *viscous*, *butyrous*, *friable*, atau *membranous*. Warna koloni, seperti; putih, kuning, oranye dan merah. Margin koloni: *smooth*, *entire*, *undulating*, *lobed*, *eroded*, atau *fringed* dengan filamen. Elevasi koloni: *flat* atau *raised*. Permukaan koloni: *glistening* atau *dull*, *smooth*, *rough*, *sectored*, *folded*, *ridged*, atau *hirsute*. Ukuran koloni: antara 0,3-2,5 mm (Kurtzman dan Fell, 1998). Contoh bentuk sel khamir disajikan pada Gambar 2.2 dan 2.3





Gambar 2.2 Bentuk Sel Khamir (Kurtzman dan Fell, 1998)



Gambar 2.3 Sel Khamir dengan Pewarnaan Sederhana Menggunakan *Methylene Blue* (Jumiyati *et al.*, 2012)

Keterangan gambar: (K1: *Saccharomyces* sp., K2: *Candida* sp., K3: *Debaryomyces* sp., K4: *Candida* sp., K5: *Candida* sp., K6: *Brettanomyces* sp.)

Khamir dapat berkembang biak secara vegetatif dan generatif. Perkembang biakan secara seksual, dilakukan dengan pembentukan spora seksual seperti: askospora, teliospora, dan basidiospora (Kurtzman dan Fell, 1998).

Perkembangbiakan aseksual dapat dilakukan dengan fragmentasi miselium dan pembentukan spora aseksual. Ada 4 cara perkembangbiakan dengan fragmentasi miselium yaitu: (a) pembentukan tunas, (b) blastospora (tunas yang tumbuh menjadi spora), misalnya pada *Candida* sp., (c) arthrospora (terjadinya segmentasi pada ujung-ujung hifa kemudian sel-sel membulat dan akhirnya lepas menjadi spora), dan (d) chlamydospora (pembulatan dan penebalan dinding sel pada hifa vegetatif) (Sumarsih, 2003).

*Budding* merupakan salah satu karakter mikroskopis dari sel khamir. Contoh tipe *budding* dari sel khamir dapat dilihat pada Gambar 2.4



Gambar 2.4 Tipe *Budding* Sel Khamir (Kurtzman dan Fell, 1998)  
Keterangan gambar: (1: monopolar, 2: bipolar, 3: pembentukan konidia (sterigmata), 4: fusi, 5: multilateral)

Khamir dapat ditemukan dimana-mana dan populasinya tergantung pada jenis dan konsentrasi material organik. Persebaran spesies, jumlah, serta karakteristik metabolisme yang ditemukan sesuai dengan kondisi lingkungan yang ada (Kutty dan Philip, 2008). Keberadaan khamir membentuk suatu komunitas, dimana setiap komunitas tersebut dapat didefinisikan sebagai

habitatnya. Habitat dari khamir akan membentuk relung ekologi yang dipengaruhi oleh faktor fisik, kimia ataupun biotik yang dibutuhkan untuk mempertahankan kelangsungan hidupnya (Kurtzman dan Fell, 1998). Untuk pertumbuhan dan perkembangbiakannya, khamir membutuhkan sumber nutrisi seperti C, H, O, N, P, S dan elemen mineral (Fe, Mg, Mn dan lainnya) (Alexander, 1961 *dalam* Ernanda, 2003). Khamir memiliki beberapa enzim penting seperti selulase, fosfatase, lipase, dan proteinase yang menyebabkan khamir memegang peran yang penting dalam dekomposisi senyawa organik dan dapat digunakan untuk keperluan industri (Spencer dan Spencer, 1997 *dalam* Kanti, 2004).

### 2.3 Fosfat

Fosfor (P) merupakan makro nutrisi penting yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman selain Nitrogen (Son *et al.*, 2006). Fosfor tersedia di alam dalam bentuk organik dan anorganik (Vance *et al.*, 2003). Fosfor organik (sebanyak 3,75% dari fosfor total) antara lain asam fitat, fitin, koenzim, fosfolipid dan asam nukleat. Sedangkan fosfor anorganik (sebanyak 25-96% dari fosfor total) antara lain  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dan  $\text{Al}(\text{OH})_2\cdot\text{H}_2\text{PO}_4$  (Sutedjo, 1989 *dalam* Ernanda, 2003).

Fosfor merupakan unsur yang diperoleh dari alam dan biasanya tidak dijumpai dalam keadaan bebas atau unsur murninya, tetapi dalam bentuk terikat seperti  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , batuan fosfor dan bahan organik (Tisdale *et al.*, 1985 *dalam* Ernanda, 2003). Fosfor organik merupakan sumber penting fosfor di tanah dan berasal dari pupuk kandang, pupuk buatan, sisa tanaman dan mineral-mineral tanah. Fraksi terbesar dari ester fosfor organik di tanah adalah asam fitat dan fitin. Kedua jenis fosfor tersebut merupakan sumber energi bagi tanaman dan biasanya terakumulasi di dalam tanah, karena memiliki kelarutan rendah (Alexander, 1961 *dalam* Ernanda, 2003). Bentuk fosfor anorganik dapat digolongkan sebagai Fe-P dan Al-P untuk tanah asam dan



Ca-P untuk tanah netral sampai alkalin (Ernanda, 2003). Ketersediaan P di dalam tanah rendah karena difiksasi sebagai fosfat tidak terlarut oleh besi, aluminium dan kalsium (Vance *et al.*, 2003).

Fosfor merupakan bagian integral tanaman di bagian penyimpanan (*storage*) dan transfer energi. Fosfor terlibat pada penangkapan cahaya dari sebuah molekul klorofil. Begitu energi tersebut sudah tersimpan dalam ADP (*adenosine diphosphate*) atau ATP (*adenosine triphosphate*), maka akan digunakan untuk menjalankan reaksi-reaksi yang memerlukan energi, seperti pembentukan sukrosa, tepung dan protein (Indranuda, 1994 dalam Raharjo *et al.*, 2007).

Elemen ini berperan dalam berbagai proses, termasuk proses penghasilan energi, sintesis asam nukleat, fotosintesis, glikolisis, respirasi, sintesis dan kestabilan membran, regulasi enzim, reaksi redoks, proses *signaling*, metabolisme karbohidrat, dan fiksasi nitrogen (N). Fosfor diserap oleh tumbuhan dalam bentuk *orthophosphate* ( $P_i$ ) berupa  $HPO_4^{2-}$  dan  $H_2PO_4^-$ , yang ada pada tanah dengan konsentrasi yang sangat rendah (0,1-10  $\mu M$ ) (Hinsinger, 2001 dalam Vance *et al.*, 2003). Jika suatu tanaman kekurangan fosfor, umumnya volume jaringan tanaman menjadi berkurang dan warna daun lebih gelap, terkadang kadar nitrat meningkat karena proses perubahan nitrat terhambat. Namun jika kelebihan fosfor, maka tanaman tersebut akan cepat tua dan mati dibanding dengan tanaman normal. Dalam tanaman, bentuk fosfat paling banyak adalah fitat (*phytate*) (Rosmarkam dan Yuwono, 2002).

Peningkatan ketersediaan fosfat bagi tanaman diusahakan dengan penggunaan pupuk fosfat anorganik maupun organik. Tetapi setelah aplikasi, ternyata sejumlah besar fosfat bentuk tersedia dari pupuk langsung diubah kedalam bentuk tidak terlarut (Omar, 1998 dalam Raharjo, 2007). Sehingga pemanfaatan pupuk tersebut kurang efektif. Upaya untuk mengatasi masalah ini, akhir-akhir ini terpusatkan pada pemanfaatan mikroba pelarut fosfat. Salah satunya adalah dengan pembuatan pupuk biologi

dengan mikroba pelarut fosfat sebagai agen biofertilizer (Raharjo, 2007).

## 2.4 Khamir Pelarut Fosfat

Peranan mikroba dalam ekosistem tanah adalah pada siklus mineral yang terdiri dari siklus nitrogen, siklus fosfor, siklus sulfur dan siklus karbon. Aktivitas enzim yang umum ditemukan dalam tanah adalah dehidrogenase, katalase, fosfatase, amilase, selulase, pektinase, protease, dan urease (Schinner *et al.*, 1996 dalam Ernanda, 2003).

Mikroba tanah menghasilkan kompleks enzim fosfatase yang berperan dalam membantu mineralisasi fosfat (Adams dan Pate, 1992 dalam Kanti, 2006). Umumnya mikroorganisme pelarut fosfat secara alami berada di tanah berkisar 0,1-0,5% dari total populasi mikroorganisme (Kucey, 1983 dalam Ginting *et al.*, 2006). Kemampuan untuk melarutkan kalsium fosfat merupakan karakter fisiologi khamir yang paling dicari untuk menentukan peran ekologiannya di dalam ekosistem tanah (Kanti, 2005). Jumlah khamir yang berpotensi sebagai pelarut fosfat berjumlah sekitar  $10^4$  dari setiap gram tanah kering (Schinner *et al.*, 1996).

Khamir memiliki peran penting seperti yang telah diketahui bahwa khamir termasuk kelompok mikroorganisme yang mampu memproduksi asam organik (khususnya sitrat) khamir juga memiliki kemampuan bertahan hidup di bawah kondisi ekstrim dalam tanah, dalam perubahan batuan fosfat dan karbonat yang tidak larut, sehingga terjadi peningkatan fosfor tersedia, Fe, dan nutrisi lainnya (Vassileva *et al.*, 2000 dalam Hesham *et al.*, 2011).

Kelarutan dari fosfat inorganik terjadi disebabkan karena adanya produksi asam organik, menunjukkan bahwa khamir yang secara umum ditemukan di rizosfer memainkan peranan dalam perubahan material organik dan mineralisasi fosfat di tanah (Hesham *et al.*, 2011). Khamir tanah pelarut fosfat diantaranya adalah *Candida* sp., *Rhodotorula* sp., *Debaryomyces* sp., *Cryptococcus* sp. (Kanti, 2006), *Saccharomyces* sp., *Hansenula*

sp., *Klockera* sp. (Narsian *et al.*, 2010), *Pichia* sp. (Kanti, 2005), *Trichosporon pullulans* (Slavikova *et al.*, 2002 dalam Kanti, 2006), *Yarrowia lypolytica* (Vassileva *et al.*, 2000 dalam Hesham *et al.*, 2011).

## **2.5 Pelarutan Fosfat**

Di dalam tanah, fosfat dapat berbentuk organik dan anorganik yang merupakan sumber fosfat penting bagi tanaman. Fosfat organik berasal dari bahan organik, sedangkan fosfat anorganik berasal dari mineral-mineral yang mengandung fosfat. Pelarutan senyawa fosfat oleh mikroorganisme pelarut fosfat berlangsung secara kimia dan biologis baik untuk bentuk fosfat organik maupun anorganik. Mikroorganisme pelarut fosfat membutuhkan adanya fosfat dalam bentuk tersedia dalam tanah untuk pertumbuhannya (Ginting *et al.*, 2006).

Mekanisme pelarutan fosfat secara kimia merupakan mekanisme pelarutan fosfat utama yang dilakukan oleh mikroorganisme. Mikroorganisme tersebut mengekskresikan sejumlah asam organik berbobot molekul rendah seperti oksalat, suksinat, tartrat, sitrat, laktat,  $\alpha$ -ketoglutarat, asetat, formiat, propionat, glikolat, glutamat, glioksilat, malat, fumarat (Ginting *et al.*, 2006). Pelarutan fosfat secara biologis terjadi karena mikroorganisme tersebut menghasilkan enzim antara lain enzim fosfatase (Lynch, 1983 dalam Ginting *et al.*, 2006) dan enzim fitase (Alexander, 1977 dalam Ginting *et al.*, 2006).

Mekanisme yang banyak terjadi untuk pelarutan fosfat adalah sekresi asam fosfatase untuk pelarutan (mineralisasi) fosfat organik (fosfomonoester, fosfodiester termasuk fosfolipid dan asam nukleat, fosfotriester, dan lainnya) dan asam organik untuk pelarutan fosfat mineral atau fosfat anorganik (Rodriguez dan Fraga, 1999).

### **2.5.1 Enzim pelarut fosfat**

Fosfat dapat dibebaskan dari komponen organik di tanah oleh 3 kelompok enzim, yaitu:



1. Fosfatase, yang melakukan defosforilasi pada ikatan fosfoester maupun fosfoanhidrida dengan materi organik.
2. Fitase, yang secara spesifik mengakibatkan pelepasan P dari asam fitik.
3. Fosfonatase dan C-P liase, yang menyebabkan pemutusan C-P pada organofosfonat.

(Rodríguez *et al.*, 2006).

Fosfatase dan fitase mendominasi di tanah sehingga diperkirakan memiliki aktivitas enzim pelarut fosfat utama (Rodríguez *et al.*, 2006). Fosfatase merupakan enzim yang akan dihasilkan apabila ketersediaan fosfat rendah. Fosfatase dieksekresikan oleh akar tanaman dan mikroorganisme, dan di dalam tanah yang lebih dominan adalah fosfatase yang dihasilkan oleh mikroorganisme (Joner *et al.*, 2000 dalam Ginting *et al.*, 2006). Enzim fosfatase dapat memutuskan fosfat yang terikat oleh senyawa-senyawa organik menjadi bentuk yang tersedia (Ginting *et al.*, 2006).

Enzim Fosfomonoesterase (FMEase) merupakan salah satu kelompok enzim fosfatase, yakni enzim yang dihasilkan dominan pada kondisi ketersediaan fosfor yang rendah dan dieksekresikan oleh tanaman dan mikroorganisme (Tabatabai, 1982 dalam Ernanda, 2003). FMEase berdasarkan reaksi yang dikatalisisnya termasuk kelompok enzim hidrolase yang berperan dalam penambahan H<sub>2</sub>O yang bekerja pada pemutusan ikatan ester fosfat (Lehninger, 1995 dalam Ginting, 2006). Fosfat dibebaskan dari fosfomonoester melalui hidrolisis secara enzimatik oleh FMEase (Ernanda, 2003).

Berdasarkan kekhususan substrat dan pH optimum, FMEase dibedakan menjadi 2 macam, yakni FMEase asam dan FMEase basa (Schinner *et al.*, 1996). Khamir dan bakteri memiliki aktivitas FMEase di dalam kisaran pH asam dan basa (Jones, 2000 dalam Ernanda, 2003). Aktivitas FMEase intraseluler umumnya tinggi di dalam kisaran basa, sedangkan pada ekstraseluler lebih umum di kisaran asam. Berdasarkan kondisi pH, aktivitas FMEase asam di dalam tanah akan tinggi

pada tanah yang bersifat asam, sedangkan aktivitas FMEase basa akan naik pada tanah alkali dan tanah netral (Schinner *et al.*, 1996).

### 2.5.2 Asam organik

Aktivitas mikroorganisme pelarut fosfat sangat tergantung pada pH tanah (Soepardi, 1983). Kecepatan mineralisasi juga meningkat dengan nilai pH yang sesuai bagi metabolisme mikroorganisme dan pelepasan fosfat akan meningkat dengan meningkatnya nilai pH dari asam ke netral. Selain itu, kecepatan mineralisasi ternyata berkorelasi langsung dengan jumlah substrat. Tanah-tanah yang kaya fosfat organik merupakan tanah yang paling aktif bagi berlangsungnya proses mineralisasi (Alexander, 1977).

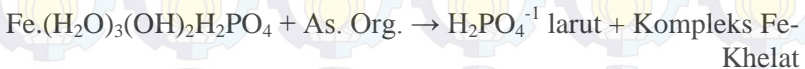
Asam-asam organik yang dihasilkan mikroorganisme berbeda kualitas dan kuantitasnya dalam membebaskan fosfat (Soepardi, 1983). Asam-asam organik yang dihasilkan mikroorganisme pelarut fosfat mempunyai kemampuan untuk melarutkan fosfat dari yang terkuat sampai terlemah menurut urutan sebagai berikut: sitrat > oksalat > tartat > malat > HCl (Kim *et al.*, 1997).

Asam organik dapat meningkatkan ketersediaan P di dalam tanah melalui beberapa mekanisme, diantaranya adalah: (1) anion organik bersaing dengan ortofosfat pada permukaan tapak jerapan koloid tanah yang bermuatan positif, sehingga memperbesar peluang ortofosfat dapat diserap oleh tanaman; (2) pelepasan ortofosfat dari ikatan logam-P melalui pembentukan kompleks logam organik (Beaucamp dan Hume, 1997 *dalam* Ginting *et al.*, 2006); dan (3) modifikasi muatan permukaan tapak jerapan oleh ligan organik (Havlin *et al.*, 1999 *dalam* Ginting *et al.*, 2006).

Asam organik mampu melarutkan fosfat anorganik dengan pengkkelatan kation (Al, Fe, Ca) oleh gugus hidroksil maupun karboksilnya dan penurunan pH tanah (Stevenson, 2005 *dalam* Khan *et al.*, 2009). Penurunan pH merupakan salah satu penyebab pelarutan kalsium fosfat menjadi orthofosfat. Produksi asam organik seperti sitrat, propionat, laktat hasil metabolisme glukosa

diyakini merupakan salah satu pendorong mineralisasi kalsium fosfat untuk menghasilkan fosfat (Tarafdar dan Marschner, 1994 dalam Kanti, 2006)

Mekanisme pelarutan dengan khelat dapat dipengaruhi oleh jenis asam organik dan bentuk fosfat yang terikat. Pembentukan khelat oleh asam organik tergantung dari jumlah dan posisi dari gugus karboksilat dan fenolik fungsionalnya (Barroso *et al.*, 2006). Asam trikarboksilat dan dikarboksilat memiliki efektivitas tinggi dalam melarutkan fosfat dibanding dengan asam monokarboksilat dan asam aromatik. Asam alifatik juga lebih efektif jika dibandingkan dengan asam fenolik, sitrat, dan fumarat. Asam organik maupun anorganik akan mengubah bentuk trikalsium-P menjadi bentuk di atau monokalsium-P sehingga mampu meningkatkan ketersediaan nutrisi fosfat untuk tanaman (Mahdi *et al.*, 2011).



Gambar 2.5 Skema Pelepasan Fosfat melalui Proses Khelat (Rao, 1994).



## **BAB III METODOLOGI**

### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Waktu penelitian direncanakan akan dilaksanakan pada bulan Februari 2015 sampai dengan bulan Juli 2015. Tempat penelitian di Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya.

### **3.2 Metode yang Digunakan**

#### **3.2.1 Isolat khamir yang digunakan**

Isolat yang digunakan sebagai bahan uji adalah isolat khamir koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya yang diisolasi dari kawasan *mangrove* Pantai Timur Surabaya (Wonorejo, Gunung Anyar dan Kenjeran) pada penelitian sebelumnya.

#### **3.2.2 Subkultur isolat khamir**

Subkultur isolat sebelum pengujian dimaksudkan untuk peremajaan isolat. Isolat diinokulasikan pada medium YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*) (Lampiran 1) miring secara aseptik dengan metode *streak continue*. Medium YMEA steril dituangkan ke dalam tabung reaksi hingga  $\pm 5$  mL. Tabung reaksi tersebut kemudian diletakkan pada posisi miring dengan sudut  $\pm 30^\circ$  dan didinginkan hingga medium memadat. Isolat diambil satu ose, kemudian digores dengan pola zig-zag pada medium YMEA miring. Tabung reaksi yang berisi subkultur ditutup menggunakan sumbat kapas dan dibalut dengan plastik *wrap*. Subkultur diinkubasi pada suhu ruang selama 24 jam atau lebih.

Keberhasilan subkultur ditandai dengan pertumbuhan koloni pada bekas pola *streak* atau gores pada medium (Harley dan Prescott, 2002).



### 3.2.3 Karakterisasi khamir

#### Pengamatan makroskopis khamir

Pengamatan karakter makroskopis dilihat berdasarkan kenampakan koloni yang tumbuh pada media YMEA padat, pengamatan yang dilakukan meliputi bentuk koloni, tekstur koloni, warna koloni, tepi atau *margin* koloni, elevasi, permukaan koloni dan ukuran koloni (Kurtzman dan Fell, 1998).

#### Pengamatan mikroskopis khamir

Pengamatan karakter mikroskopis khamir dilakukan dengan melihat karakteristik reproduksi generatif melalui pembentukan askospora dan basidiospora. Serta pengamatan reproduksi vegetatif seperti pembentukan tunas (*budding*) dengan tipe; multipolar, bipolar, unipolar dan fusi. Karakteristik vegetatif lainnya yaitu pembentukan spora aseksual meliputi; arthrospora, blastospora dan chlamydospora, terdapat pula karakter mikroskopis lain seperti bentuk sel, ukuran sel dan ada tidaknya pseudohifa dan hifa sejati (miselium). Pengamatan secara mikroskopis dilakukan dengan cara membuat preparat biakan di atas kaca obyek kemudian diwarnai dengan laktofenol dan ditutup dengan gelas penutup lalu ditetesi dengan minyak imersi, pengamatan karakteristik sel khamir dilakukan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x dan 1000x (Kurtzman dan Fell, 1998).

#### 3.2.4 Pembuatan medium selektif Pikovskaya

Media Pikovskaya padat terdiri dari 5 g  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ditambah 10 g glukosa, 0,2 g NaCl, 0,2 g KCl, 0,0025 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,0025 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g *yeast extract*, dan 30 g agar dilarutkan dalam 1000 mL air destilasi (Ernanda, 2003). Setelah itu medium dihomogenkan dan dipanaskan dengan *hot plate magnetic stirrer* hingga mendidih. Medium kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15-20 menit.

Setelah media steril, didinginkan pada suhu kamar selama 30 menit dan dituang ke dalam cawan Petri steril sekitar 8 mL (Ernanda, 2003). Medium Pikovskaya berwarna putih keruh

karena mengandung P tidak terlarut seperti kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Raharjo *et al.*, 2007). Medium ini digunakan untuk mengetahui isolat khamir yang berpotensi melarutkan fosfat (Kanti, 2006).

### 3.2.5 Uji potensi isolat khamir sebagai pelarut fosfat

Uji potensi isolat sebagai pelarut fosfat dilakukan secara kualitatif. Medium Pikovskaya padat di dalam cawan Petri kemudian diinokulasikan dengan isolat khamir yang akan diuji menggunakan metode *spot inoculation*. Selanjutnya kultur diinkubasi pada suhu ruang dan diamati setiap 24 jam selama 7 hari.

Khamir yang dapat melarutkan fosfat adalah isolat yang menghasilkan zona bening disekeliling koloni yang tumbuh (Kanti, 2006). Zona bening dan diameter koloni dihitung setiap 24 jam selama 7 hari untuk mendapatkan indeks pelarutan fosfat. Untuk menghitung SI (*Solubilizing Index*) atau IPF (Indeks Pelarutan Fosfat) menurut (Arun dan Sridhar, 2005 *dalam* Jena dan Rath, 2013) digunakan rumus sebagai berikut :

$$\text{IPF} = \frac{\text{X1} + \text{X2}}{\text{X2}}$$

Gambar 3.1 Rumus perhitungan indeks pelarutan fosfat

Keterangan gambar: IPF = Indeks Pelarutan Fosfat; X1 = Zona bening (cm); X2 = Diameter koloni (cm).

Dua isolat dengan hasil uji pelarut fosfat terbaik pada medium Pikovskaya padat selanjutnya diidentifikasi hingga genus dan dipilih untuk pengujian kuantitatif.

### 3.2.6 Identifikasi khamir pelarut fosfat

Identifikasi khamir pelarut fosfat dilakukan hingga tingkat genus berdasarkan buku panduan identifikasi “*The Yeast a Taxonomic Study*” (Kurtzman dan Fell, 1998). Identifikasi dilakukan dengan melakukan uji lanjutan yaitu uji fisiologis setelah dilakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis pada isolat khamir. Isolat yang telah diketahui genusnya kemudian diuji secara kuantitatif.

### 3.2.7 Uji fisiologis

Uji fisiologis yang dilakukan dalam penelitian ini, disesuaikan berdasarkan uji fisiologis secara umum yang dilakukan oleh Kurtzman dan Fell (1998); Kreger-van Rij (1987) yang meliputi uji fermentasi gula, uji urease, uji askospora dan uji pertumbuhan pada media cair.

#### Uji fermentasi gula

Jenis gula yang diujikan di dalam penelitian ini meliputi glukosa, laktosa, maltosa, galaktosa, manitol dan sorbitol. Uji fermentasi gula dilakukan dengan menginokulasikan 1 ose isolat yang telah berumur 48-78 jam ke dalam medium steril uji fermentasi gula dan ditambahkan *bromthymol blue* (sebagai indikator) (Lampiran 2) (Wickerham, 1951 dalam van Rij, 1987).

#### Uji urease

Uji urease menggunakan media *Urea Broth* (Lampiran 3) (komposisi berdasarkan produk SIGMA-ALDRICH dan van-Rij, 1987). Diinokulasikan satu ose isolat khamir secara aseptis pada media yang mengandung urea dan diinkubasi pada suhu 28-30°C. Diamati pertumbuhan khamir selama 7 hari, hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna medium dari merah kuning menjadi merah keunguan.

#### Uji askospora

Uji ini dilakukan dengan metode modifikasi Schaeffer-Futon's. Untuk keperluan uji askospora, isolat-isolat yang telah disubkultur ditumbuhkan pada medium *Corn Meal Agar* dengan metode slide culture agar (Lampiran 4). Isolat diinkubasi selama 7 hari, pada akhir inkubasi isolat yang tumbuh diwarnai dengan *malachite green* 0,5% pada bagian kaca penutup dan kaca obyek yang terdapat bekas pertumbuhan khamir. Selanjutnya dilakukan pemanasan dengan uap air (di atas air mendidih) selama 5 menit dan ditetesi *malachite green* 0,5%. Saat kaca obyek cukup dingin, dilakukan pembilasan dengan akuades selama 30 detik secara hati-hati kemudian preparat ditetesi safranin 0,5% selama 30 detik. Dilakukan pengamatan preparat di bawah mikroskop



perbesaran 1000x dengan bantuan minyak imersi. Askospora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif berwarna merah.

### **Uji pertumbuhan pada media cair**

Isolat khamir diinokulasikan pada medium YMB (*Yeast Malt Broth*) (Lampiran 1) diinkubasi pada suhu ruang dan diamati pertumbuhannya setiap 24 jam selama 7 hari. Karakter makroskopis yang diamati adalah keberadaan cincin, membran dan pelikel pada permukaan medium serta endapan pada dasar medium.

Pengamatan mikroskopis pada media cair dilakukan dengan cara mengambil 1 ose isolat khamir pada kaca obyek kemudian difiksasi dan ditambahkan dengan *lactophenol tryphan blue* dan ditutup dengan kaca penutup. Pengamatan dilakukan dibawah mikroskop dengan perbesaran 400x, pengukuran sel dilakukan dengan menggunakan lensa mikrometer okuler. Karakteristik yang diamati berupa bentuk dan ukuran sel, keberadaan pseudohifa atau hifa, serta tipe pertunasan.

### **3.2.8 Persiapan uji pelarutan fosfat secara kuantitatif**

#### **Larutan pereaksi fosfat**

Pereaksi fosfat pekat dibuat dengan melarutkan 1,2 g ammonium molibdat  $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}]$  dalam 50 ml aquades pada labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan 0,0277 g kalium antimonil tartrat  $[\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 0,5\text{H}_2\text{O}]$  dihomogenkan, selanjutnya ditambah aquades sampai volume menjadi 100 ml dan dihomogenkan. Pembuatan pereaksi pewarna fosfat pekat dengan melarutkan 0,106 gr asam askorbat ke dalam 10 ml pereaksi fosfat pekat. Pereaksi pewarna fosfat pekat harus dalam kondisi baru (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati *et al.*, 2007).

#### **Larutan standar fosfat**

Larutan standar fosfat dibuat dari larutan standar induk titrisol (50 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$ ). Larutan standar 50 ppm  $\text{PO}_4^{3-}$  diencerkan dengan aquades dan ditentukan deret larutan standar Fosfat dengan konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,3; dan 0,4 ppm. Masing-masing diambil 5 mL, setiap konsentrasi larutan standar fosfat ditambah 0,5 mL pereaksi fosfat, dikocok beberapa menit dan didiamkan 15

menit. Setiap konsentrasi larutan standar fosfat diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV-VIS  $\lambda$  880 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar fosfat lalu dibuat grafik yang menghubungkan antara nilai absorbansi dengan konsentrasi larutan standar fosfat.

### **3.2.9 Uji pelarutan fosfat oleh khamir secara kuantitatif**

Uji pelarutan fosfat oleh khamir secara kuantitatif dilakukan untuk mengetahui kekuatan isolat dalam melarutkan fosfat, isolat yang digunakan adalah 2 isolat yang paling unggul dalam uji kualitatif sebelumnya

#### **Pembuatan suspensi khamir**

Pembuatan suspensi khamir dilakukan dengan cara mengambil sebanyak beberapa ose kultur khamir dari media YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*) *slant* untuk dimasukkan ke dalam 100 mL air fisiologis steril hingga didapatkan OD 0,5 pada panjang gelombang 600 nm. Dari 100 mL suspensi khamir yang telah dibuat masing-masing dimasukkan 6 mL ke dalam 8 buah *Erlenmeyer* yang telah berisi medium Pikovskaya cair untuk selanjutnya dilakukan inkubasi.

#### **Perlakuan pelarutan fosfat pada isolat uji**

Medium Pikovskaya sebanyak 54 mL secara aseptik dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 250 mL. Suspensi masing-masing isolat diinokulasikan sebanyak 6 mL ke dalam Erlenmeyer yang telah berisi medium Pikovskaya cair tersebut. Kultur diinkubasi pada suhu ruang dengan digoyangkan secara kontinyu menggunakan *rotary shaker* 130 rpm. Pada tiap akhir waktu inkubasi dilakukan pengukuran kadar fosfat, pengukuran dilakukan setelah kultur diinkubasi selama 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 hari.

#### **Pengukuran pelarutan fosfat**

Kultur dipanen dan diinokulasikan pada medium YMEA dengan metode *Pour Plate* untuk didapatkan jumlah koloni khamir pada tiap waktu inkubasi. Metode *Pour Plate* dilakukan dengan cara diambil sebanyak 1 mL kultur dan dituangkan ke dalam cawan Petri steril secara aseptis kemudian ditambahkan



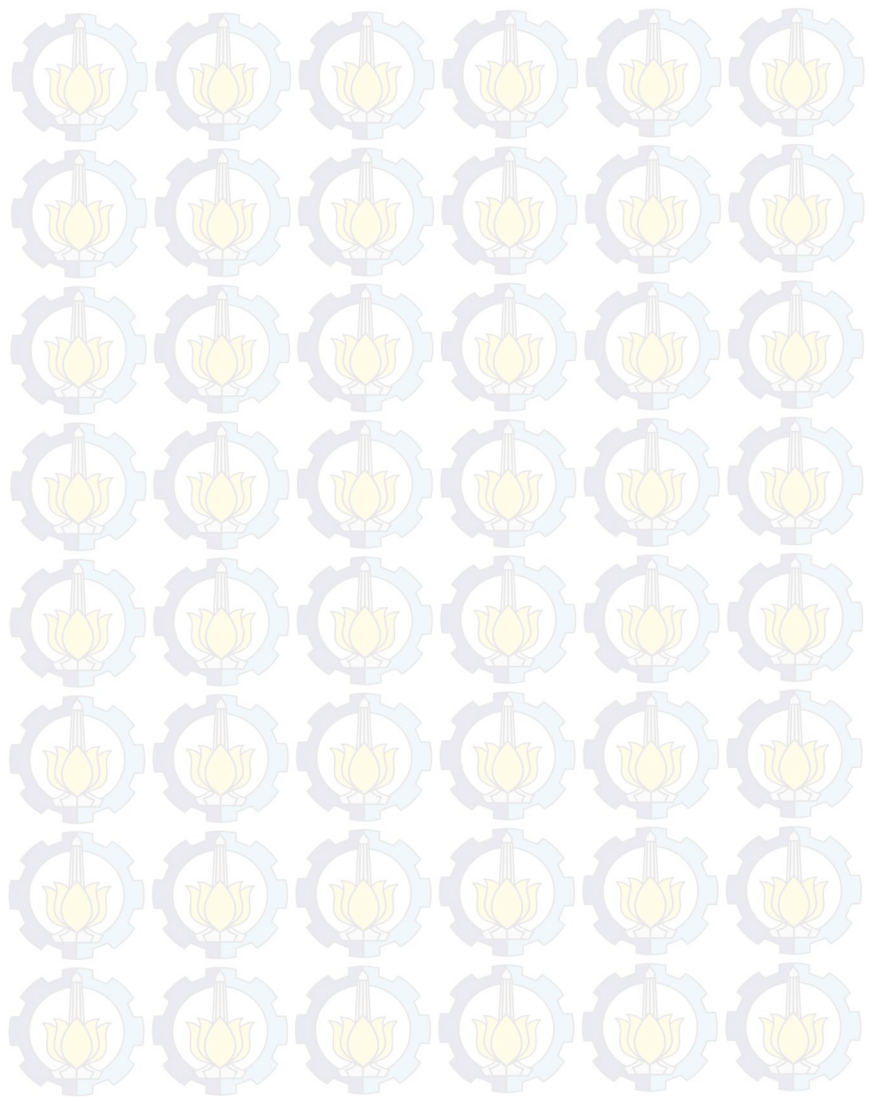
YMEA yang masih hangat ke dalam cawan Petri. Cawan Petri digoyangkan dengan gerakan membentuk angka delapan agar medium dan suspensi khamir homogen. Setelah itu diinkubasi  $\pm 4$  hari hingga muncul koloni khamir dan dilakukan perhitungan jumlah koloni tersebut.

Sebanyak 20 ml kultur perlakuan diambil, kemudian disaring menggunakan Whatman Paper No 42 dan disentrifuse dengan kecepatan 4.000 rpm selama 15 menit (Santosa, 2007 dalam Saraswati *et al.*, 2007). Sebanyak 3 mL supernatan hasil sentrifugasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu ditambah 0,5 mL pereaksi fosfat dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian serapan diukur pada  $\lambda$  880 nm. Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar dan blanko (menggunakan air destilasi) (Ernanda, 2003). Kadar fosfat dihitung dengan persamaan garis  $y = ax + b$  pada grafik standar larutan fosfat.

### **3.3 Rancangan Penelitian dan Analisa Data**

Penelitian dilakukan secara deskriptif untuk mengetahui potensi pelarutan fosfat dan secara kuantitatif untuk menguji kemampuan isolat melarutkan fosfat (mg/L).

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Karakterisasi Khamir

Karakterisasi khamir yang dilakukan terdiri atas karakterisasi makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan karakteristik makroskopis dilakukan pada bentukan koloni tunggal (Gambar 4.1) yang meliputi bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, tekstur koloni, permukaan koloni, warna koloni, dan ukuran koloni. Hasil karakter makroskopis tiap isolat ditunjukkan pada Tabel 4.1.



→ Koloni tunggal

Gambar 4.1 Karakterisasi Makroskopis Isolat W1.1 dengan Metode *Streak Continue*.

Tabel 4.1 Karakteristik Makroskopis Isolat Khamir dari Kawasan *Mangrove* Pantai Timur Surabaya.

Isolat	Bentuk	Tepi	Elevasi	Tekstur	Permukaan	Warna	Ukuran (cm)
W1.1	<i>Circular</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Halus mengkilap	Putih kekuningan	0,1-1
W1.2	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Halus mengkilap	Putih kekuningan	0,1-1,5
W2.3	<i>Irregular</i>	<i>Serrate</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,8
W3.8	<i>Circular</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Membranous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,5
W4.12	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Kering seperti bubuk	Putih	0,1-0,7
W4.15	<i>Circular</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,5

Lanjutan Tabel Tabel 4.1 Karakteristik Makroskopis Isolat Khamir dari Kawasan *Mangrove* Pantai Timur Surabaya.

Isolat	Bentuk	Tepi	Elevasi	Tekstur	Permukaan	Warna	Ukuran (cm)
W5.1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,5
W6.1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Mucoid</i>	Halus mengkilap	Putih kekuningan	0,1-0,5
W7.3	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,3
W8.1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,4
G1.1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,3
G1.2	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih kekuningan	0,1-0,4
G2.5	<i>Irregular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Raised</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,2-0,6
G3.2	<i>Circular</i>	<i>Undulate</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,3
G3.3	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Halus mengkilap	Merah muda	0,1-0,3
G4.1	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Convex</i>	<i>Membranous</i>	Kasar	Cokelat kehitaman	0,1-0,5
G7.1	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Membranous</i>	Kering seperti bubuk	Putih	0,1-0,5
G8.1	<i>Irregular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Halus mengkilap	Putih kekuningan	0,1-2,5
G9.1	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Membranous</i>	Kasar	Putih kekuningan	0,1-1,9
G10.1	<i>Circular</i>	<i>Entire</i>	<i>Convex</i>	<i>Viscous</i>	Halus mengkilap	Merah muda	0,1-0,8
K1	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,01-0,2
K2	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar seperti bubuk	Putih kekuningan	0,1-1
K4.1	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar seperti bubuk	Putih	0,01-0,4
K4.2	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar seperti bubuk	Putih	0,1-0,5
K5	<i>Filamentous</i>	<i>Filamentous</i>	<i>Umbonate</i>	<i>Viscous</i>	Kasar	Putih	0,1-0,5



Pada Tabel 4.1 tampak bahwa koloni khamir bervariasi dalam hal bentuk koloni, tepi koloni, elevasi koloni, tekstur koloni, permukaan koloni, warna koloni, dan ukuran koloni. Koloni khamir ditumbuhkan pada media padat. Media padat biasanya digunakan untuk melakukan pengamatan morfologi sel. Media yang biasa digunakan adalah *glucose-peptone-yeast extract-malt agar* yang diinkubasi selama 7 hari (Kurtzman dan Fell, 1998). Berdasarkan Tabel 4.1 diatas dapat dilihat bahwa bentuk khamir yang paling dominan adalah *circular*. Bentuk sirkuler adalah bentuk kebanyakan genus *Candida* (Nurhariyati *et al.*, 2004). Tekstur koloni yang paling sering dijumpai adalah *viscous*. Tekstur lain koloni pada khamir biasanya juga berupa *mucoïd*, *fluid*, *butyrous*, *friable*, dan *membranous*. Tekstur khamir yang berlendir atau *mucoïd* sering dihubungkan dengan adanya enkapsulasi sel yang merupakan akibat dari produksi polisakarida ekstraseluler, sedangkan tekstur khamir yang bermembran atau *membranous* umumnya berasal dari bentukan filamen yang banyak (Kurtzman dan Fell, 1998).

Berdasarkan pengamatan makroskopis warna koloni khamir umumnya berwarna putih namun ada beberapa isolat yang memiliki perbedaan warna. Isolat dengan kode W1.1, W1.2, W6.1, G1.2, G8.1, G9.1, dan K.2 memiliki warna putih kekuningan sedangkan isolat G3.3 dan G10.1 memiliki warna merah muda. Isolat G4.1 memiliki warna coklat kehitaman. Beberapa koloni memiliki warna khusus seperti kuning, oranye, dan merah. Namun warna putih atau tidak berpigmen sampai warna krem adalah karakteristik kebanyakan khamir (Kurtzman dan Fell, 1998). Pigmentasi merupakan karakter khusus pada jenis khamir seperti *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, dan *Rhodospiridium* (Frazier, 1986 dalam Nurhariyati *et al.*, 2004). Warna yang mencolok pada koloni disebabkan karena terjadi sekresi zat warna ke dalam medium atau pigmentasi sel. Koloni yang berwarna merah berasal dari karotenoid (Schlegel, 1993 dalam Nurhariyati *et al.*, 2004).

Permukaan koloni khamir yang diamati beragam yaitu *glistening* atau halus mengkilap, *rough* atau kasar, dan halus seperti bubuk. *Strain* yang tadinya *smooth* ketika pertama diisolasi dapat berubah menjadi *rough* ketika berada dalam agar dalam waktu yang lama. Pada beberapa kasus, perubahan ini juga dapat biasanya terjadi diiringi dengan perubahan dari *butyrous* menjadi *membranous* yang biasanya terjadi pada *Candida albicans* dan *Candida tropicalis* pada medium YMEA yang disimpan selama beberapa tahun (Kurtzman dan Fell, 1998). Elevasi isolat khamir didominasi oleh bentuk *umbonate* dan sisanya memiliki elevasi *convex*. Tepi koloni khamir beragam ada yang *entire*, *filamentous*, dan *undulate*.

Pengamatan mikroskopis khamir dilakukan dengan pewarnaan laktofenol dan diamati dengan mikroskop perbesaran 400x. Metode pewarnaan ini merupakan metode khusus untuk pewarnaan mikroorganisme jenis fungi (Harley dan Prescott, 2002). Isolat yang ditumbuhkan pada media cair *Yeast Malt Broth* (YMB) biasa digunakan untuk memudahkan dalam mengamati morfologi sel, *budding*, serta ada tidaknya pseudohifa atau hifa. Pertumbuhan khamir dalam medium cair memberikan hasil pertumbuhan khamir apakah *floating* atau *sedimen* (Kurtzman dan Fell, 1998). Hasil pengamatan mikroskopis khamir ditunjukkan pada Tabel 4.2 dibawah ini.

Tabel 4.2 Hasil Pengamatan Mikroskopis Khamir dalam Media *Yeast Malt Broth* (YMB)

Isolat	Bentuk Sel	Ukuran (µm)	Budding	Pseudohifa	Hifa
W1.1	Bulat	3,2 x 2,1	Multilateral	-	√
W1.2	Oval	3,2 x 2,6	Bipolar	√	-
W2.3	Oval	3 x 2,2	Multilateral	-	√
W3.8	Oval	2,6 x 2,8	Multilateral	√	-
W4.12	Oval	3 x 2	Fusi	√	-
W4.15	Oval	3,8 x 2,5	Multilateral	-	√
W5.1	Oval	2,7 x 1,9	Multilateral	√	-

Lanjutan Tabel 4.2 Hasil Uji Mikroskopis *Yeast* dalam Media *Yeast Malt Broth* (YMB)

Isolat	Bentuk Sel	Ukuran (µm)	Budding	Pseudohifa	Hifa
W6.1	Oval	2,4 x 1,9	Multilateral	-	-
W7.3	Oval	3,8 x 2,8	Multilateral	√	-
W8.1	Oval	4,3 x 1,7	Fusi	-	-
G1.1	Oval	5,8 x 8,6	Multilateral	-	√
G1.2	Oval	0,7 x 4,2	Fusi	-	√
G2.5	Oval	4,1 x 7,4	Fusi	√	-
G3.2	Oval	0,6 x 1,1	Multilateral	√	-
G3.3	Bulat	4,2 x 4,6	Multilateral	√	-
G4.1	Oval	2,7 x 3,4	Fusi	-	√
G7.1	Oval	1,1 x 1,7	Fusi	√	-
G8.1	Oval	1,4 x 4,1	Fusi	-	-
G9.1	Oval	2,1 x 8,8	Bipolar	√	-
G10.1	Oval	1,6 x 3,1	Fusi	-	√
K1	Oval	1,3 x 3,2	Multilateral	√	-
K2	Oval	1,0 x 3,2	Multilateral	-	-
K4.1	Oval	1,3 x 3,5	Multilateral	√	-
K4.2	Oval	1,8 x 2,7	Multilateral	√	-
K5	Oval	1,4 x 3,8	Fusi	√	-

Sel *budding* maupun sel vegetatif khamir memiliki bentuk yang berbeda-beda tergantung jenis khamir nya, oleh karena itu pada spesies tertentu baik bentuk *budding* maupun spora biasanya dimasukkan dalam karakterisasi (van-Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998). Berdasarkan Tabel 4.2 diatas bentuk sel khamir yang dominan adalah oval. Menurut Kurtzman dan Fell (1998) genus *Candida* biasanya memiliki bentuk sel berbetuk oval, bulat atau silindris. Isolat-isolat khamir ada yang membentuk hifa atau pseudohifa. Dari isolat khamir rata-rata memiliki bentuk *multilateral budding*, namun ada yang bertipe bipolar dan fusi.



#### 4.2 Potensi Isolat Khamir sebagai Pelarut Fosfat

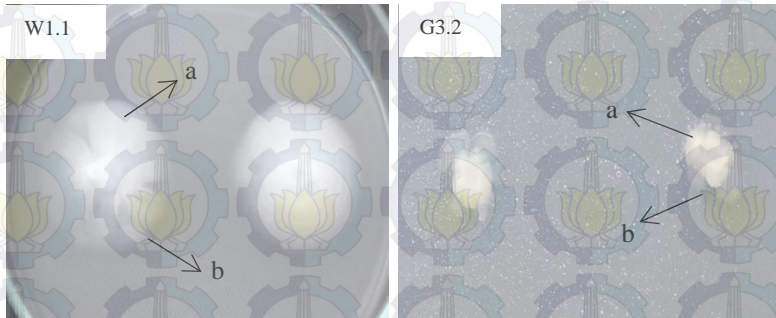
Potensi isolat khamir sebagai pelarut fosfat dilihat dengan melakukan uji secara kualitatif. Dari dua puluh lima isolat khamir koleksi Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi, Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya, dua puluh dua isolat diantaranya berpotensi sebagai khamir pelarut fosfat. Kemampuan isolat khamir dalam melarutkan fosfat dapat dilihat dari terbentuknya zona bening pada medium Pikovskaya padat (Lampiran 5) dan diambil dua isolat terbaik (Gambar 4.2) dari uji kualitatif untuk selanjutnya diidentifikasi dan diuji kuantitatif.

Medium Pikovskaya berwarna putih keruh karena mengandung P tidak terlarut seperti kalsium fosfat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) (Raharjo *et al.*, 2007). Medium ini digunakan untuk mengetahui isolat khamir yang berpotensi melarutkan fosfat (Kanti, 2006). Isolat khamir yang mampu membentuk zona bening pada medium Pikovskaya padat adalah isolat dengan kode W1.1, W1.2, W2.3, W3.8, W4.12, W4.15, W5.1, W6.1, W7.3, W8.1, G1.1, G1.2, G2.5, G3.2, G7.1, G8.1, G9.1, G10.1, K2, K4.1, K4.2, dan K5. Sedangkan isolat khamir yang tidak membentuk zona bening hingga masa akhir inkubasi (hari ke-7) adalah isolat dengan kode G3.3, G4.1, dan K1.

Kemampuan isolat khamir dalam membentuk zona bening bervariasi. Isolat khamir dengan kode W1.1, W1.2, W2.3, G1.2, G9.1, G10.1 mampu membentuk zona bening pada hari pertama inkubasi, isolat G1.1, G7.1, K2, K4.1, K4.2 pada hari kedua, isolat W3.8, W4.15, W7.3, G2.5 pada hari ketiga, isolat W5.1, W6.1, W8.1, G3.2 pada hari keempat, isolat W4.12, G8.1, K5 pada hari kelima. Isolat khamir tersebut mampu membentuk zona bening karena menghasilkan asam organik. Khamir termasuk kelompok mikroorganisme yang mampu memproduksi asam organik (khususnya sitrat) (Vassileva *et al.*, 2000 dalam Hesham *et al.*, 2011). Asam organik menyebabkan terjadinya pelarutan fosfat dari sumber fosfat terikat menjadi bentuk yang tersedia (Khiari dan Parent, 2005). Asam organik mampu berikatan



dengan ion Ca dari  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  dan membebaskan  $\text{H}_2\text{PO}_4$  sehingga membentuk area yang berwarna jernih (Widawati dan Suliasih, 2005). Asam organik dihasilkan melalui proses metabolisme glukosa dan siklus asam trikarboksilat (TCA) yang merupakan kelanjutan dari reaksi glikolisis (Dawes dan Sutherland, 1976).



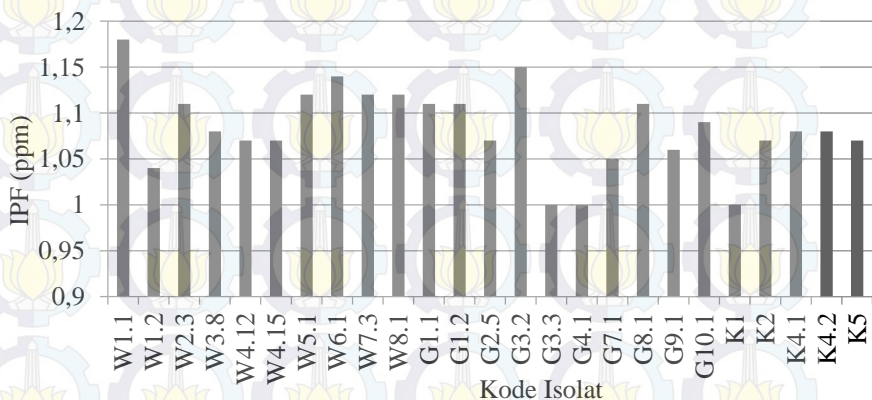
Gambar 4.2 Dua Isolat Terbaik Hasil Uji Kualitatif  
Keterangan gambar: a.Koloni; b.Zona bening

Isolat khamir yang tidak membentuk zona bening pada medium Pikovskaya padat disebabkan isolat tidak mensekresikan asam organik atau sekresi asam organik relatif lama sehingga tidak teramati dengan waktu inkubasi selama 7 hari. Kemampuan khamir pelarut fosfat dalam melarutkan fosfat berbeda-beda tergantung jenis strain (Gunadi *et al.*, 1993 dalam Ginting, 2006). Asam-asam organik yang dihasilkan mikroorganisme berbeda kualitas dan kuantitasnya dalam membebaskan fosfat (Soepardi, 1983). Jumlah dan jenis asam organik inilah yang berperan dalam menentukan tingginya pelarutan fosfat (Suliasih, 2006).

Rata-rata diameter koloni khamir yang diuji setiap harinya mengalami pertambahan seiring waktu inkubasi (Lampiran 6). Diameter koloni menunjukkan pertumbuhan isolat khamir. Rata-rata diameter koloni paling besar ditunjukkan oleh isolat W1.1 sebesar 2,72 cm dan paling kecil isolat K1 sebesar 0,47 cm. Rata-rata zona bening setiap isolat hingga akhir waktu inkubasi bervariasi, lebar zona bening dapat diketahui melalui diameter

total (Lampiran 7) dikurangi diameter koloni. Secara umum zona bening akan bertambah dengan diiringi pertambahan diameter koloni (Premono *et al.*, 1996 dalam Mukri *et al.*, 2014). Luas zona bening yang terbentuk menunjukkan besar kecilnya kemampuan khamir membebaskan fosfat dari ikatan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  secara kualitatif (Rachmiati, 1995 dalam Widawati dan Muharam, 2012).

Dari 25 isolat yang diuji kualitatif hingga akhir masa inkubasi 22 isolat mampu membentuk zona bening (Lampiran 8) dan Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) isolat khamir bervariasi, terdapat 2 isolat yang memiliki nilai IPF relatif lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat lain (Gambar 4.3) (Lampiran 9).

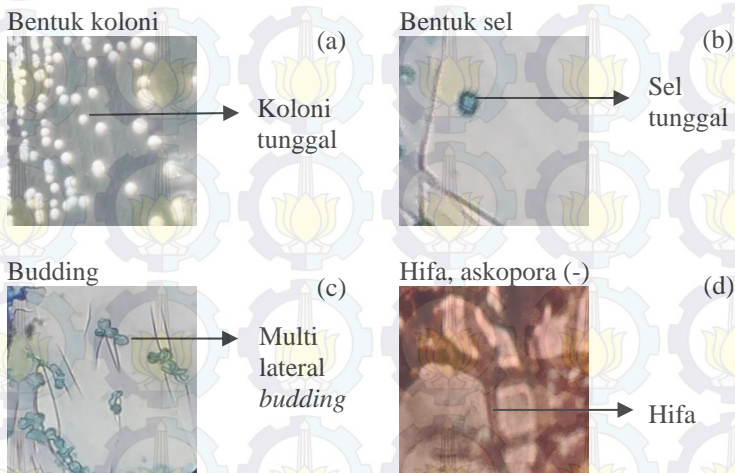


Gambar 4.3 Grafik Indeks Pelarutan Fosfat (IPF) pada Akhir Waktu Inkubasi

Isolat dengan kode W1.1 memiliki nilai IPF sebesar 1,18, dan isolat G3.2 sebesar 1,15. Isolat W1.1 memiliki nilai IPF yang relatif lebih tinggi dibandingkan isolat lainnya karena memiliki hasil perbandingan diameter koloni dan zona bening yang relatif lebih besar. Variasi indeks tersebut dapat disebabkan karena perbedaan kemampuan isolat dalam mensekresikan asam organik ekstraselulernya sehingga zona bening yang terbentuk berbeda.

### 4.3 Identifikasi Khamir Pelarut Fosfat

Dua isolat terbaik hasil uji kualitatif dengan kode W1.1 dan G3.2 kemudian diidentifikasi hingga tingkat genus. Identifikasi dilakukan berdasarkan buku panduan identifikasi “The Yeasts a Taxonomic Study” (Kurtzman dan Fell, 1998; van-Rij, 1984). Identifikasi dilakukan dengan menambahkan uji lanjutan yaitu uji fisiologis setelah dilakukan pengamatan makroskopis dan mikroskopis. Identifikasi khamir dapat dilakukan dengan uji fisiologis atau uji biokimia, uji askospora serta uji pertumbuhan pada medium cair. Uji biokimia yang dilakukan meliputi uji fermentasi gula dan uji urease. Uji fermentasi gula meliputi glukosa, laktosa, maltosa, galaktosa, manitol dan sorbitol (Gambar 4.4, 4.5, 4.6, dan 4.7)



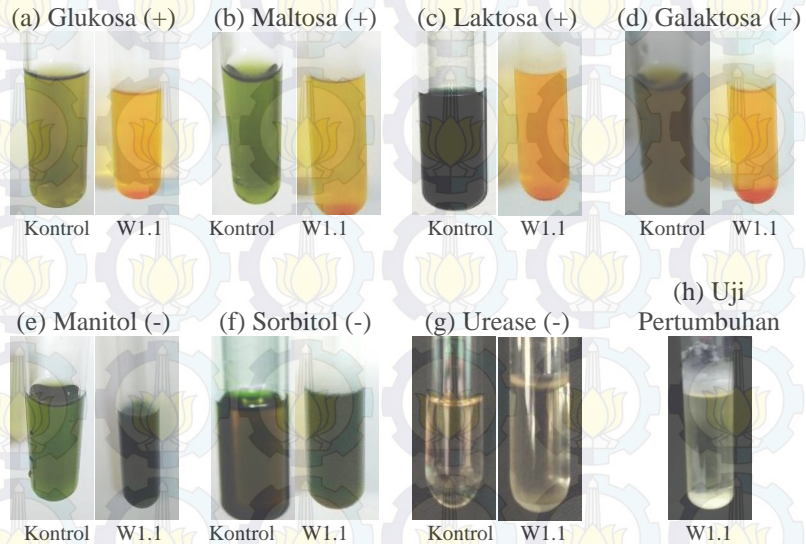
Gambar 4.4 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat W1.1

Keterangan gambar: (a)Bentuk koloni *circular*, (b)Bentuk sel bulat, (c)Multilateral *budding*, (d)Tidak mempunyai askospora dan membentuk hifa.

Dari pengamatan makroskopis isolat khamir dengan kode W1.1 memiliki bentuk koloni *circular*, berwarna putih dan saat



diamati dengan mikroskop sel nya berbentuk bulat, memiliki multiateral *budding* dan membentuk hifa serta tidak memiliki askospora.



Gambar 4.5 Hasil Uji Fisiologis Isolat W1.1

Keterangan gambar: (a)Kontrol (K): hijau, W1.1 positif (+): kuning, (b)K: hijau, W1.1 positif (+): kuning, (c)K: hijau, W1.1 positif (+):kuning, (d)K: hijau, W1.1 positif (+): kuning, (e)K: hijau, W1.1 negatif (-): hijau, (f)K: hijau, W1.1 negatif (-): hijau, (g)K: merah kekuningan, W1.1 negatif(-): merah kekuningan, (h)Terbentuk pelikel dan sedimen.

Berdasarkan uji fisiologis isolat W1.1 menunjukkan hasil positif terhadap uji fermentasi glukosa, maltosa, laktosa, dan galaktosa yang ditandai dengan berubahnya warna medium uji dari hijau menjadi kuning. Perubahan warna yang terjadi diasumsikan karena isolat khamir menghasilkan asam organik sehingga medium berubah menjadi asam.

Kemampuan dalam melakukan metabolisme karbohidrat dapat dilihat dari perubahan warna medium dari warna asal



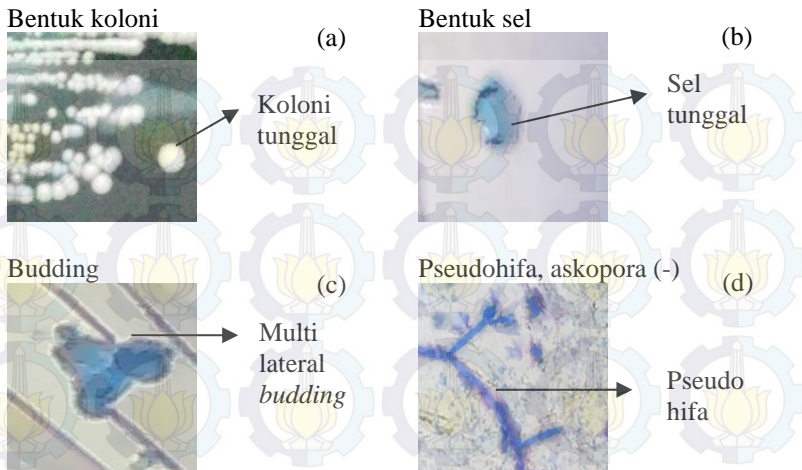
menjadi berwarna kuning yang menunjukkan dihasilkannya asam organik (Harley dan Prescott, 2002). Adanya metabolit sekunder hasil fermentasi berupa asam-asam organik menyebabkan nilai pH menurun (Hawusiwa *et al.*, 2015).

Pada uji fermentasi manitol dan sorbitol menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada medium yaitu tetap berwarna hijau, dan pada uji urease menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna media uji yaitu tetap berwarna merah kekuningan. Pada medium cair, tampak terbentuknya pelikel dan sedimen.

Karakter yang dimiliki isolat W1.1 mirip dengan karakter yang dimiliki genus *Candida*. Van-Rij (1987); Kurtzman dan Fell (1998) menyatakan bahwa genus *Candida* termasuk kelompok khamir *imperfecti* yakni, reproduksi seksualnya belum jelas, merupakan kelompok khamir *anamorphic Ascomycetes* yang tidak menghasilkan askospora atau *non-ascosporogenous yeast*. Dari Gambar 4.4 menunjukkan hasil uji askospora negatif.

Genus *Candida* seringkali membentuk pseudohifa dengan blastospora yang muncul di persimpangan sel pseudohifa yang saling berdekatan. Reproduksi vegetatifnya dengan multilateral *budding*. Selain itu kebanyakan dari spesies *Candida* selalu membentuk pseudohifa maupun hifa (van-Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998), hal ini sesuai dengan karakter yang dimiliki isolat pada Gambar 4.4 yang memperlihatkan adanya bentuk hifa.

*Candida* tidak memiliki pigmen karotenoid (van -Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998), karakter ini mirip dengan isolat W1.1 yang ditunjukkan pada Gambar 4.4 yakni warna koloni isolat tersebut putih. *Candida* memiliki bentuk sel *globose*, *ovoid*, *silindris*, *elongate*, *ogival*, *triangular*, dan *lunate*. Beberapa spesies ada yang mampu memfermentasi gula dan beberapa yang lainnya tidak (van -Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998). Bentuk koloni sering kali bundar dengan tepian menyebar maupun penuh, dan elevasi cembung. *Candida* tidak menghasilkan urease, membentuk pelikel di permukaan media dan endapan berwarna putih (Nurhariyati *et al.*, 2004 ).



Gambar 4.6 Karakteristik Makroskopis dan Mikroskopis Isolat G3.2

Keterangan gambar: (a)Bentuk koloni *circular*, (b)Bentuk sel oval, (c)Multilateral *budding*, (d)Tidak mempunyai askospora dan membentuk pseudohifa.

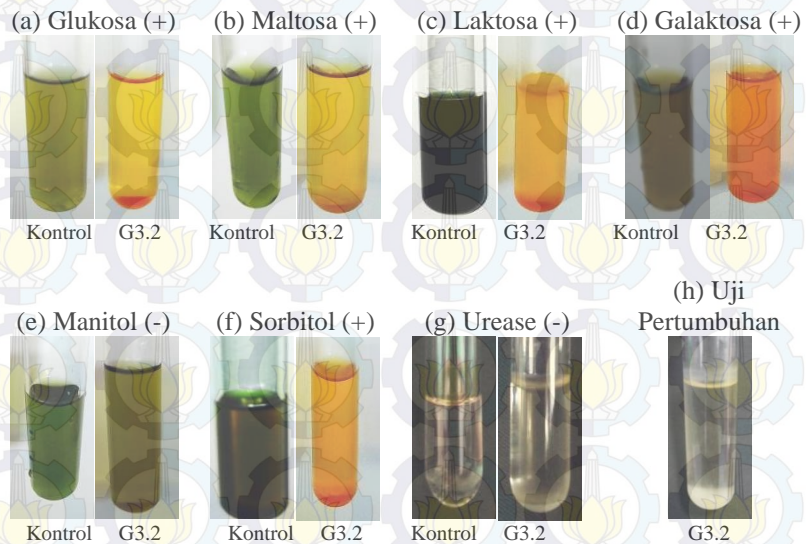
Dari pengamatan makroskopis isolat khamir dengan kode G3.2 memiliki bentuk koloni *circular*, berwarna putih dan saat diamati dengan mikroskop sel nya berbentuk oval, memiliki multilateral *budding* dan pseudohifa serta tidak memiliki askospora.

Berdasarkan uji fisiologis isolat G3.2 menunjukkan hasil positif terhadap uji fermentasi glukosa, maltosa, laktosa, galaktosa, dan sorbitol yang ditandai dengan berubahnya warna medium uji dari hijau menjadi kuning. Perubahan warna yang terjadi diasumsikan karena isolat khamir menghasilkan asam organik sehingga medium berubah menjadi asam.

Kemampuan dalam melakukan metabolisme karbohidrat dapat dilihat dari perubahan warna medium dari warna asal menjadi berwarna kuning yang menunjukkan dihasilkannya asam organik (Harley dan Prescott, 2002). Adanya metabolit sekunder

hasil fermentasi berupa asam-asam organik menyebabkan nilai pH menurun (Hawusiwa *et al.*, 2015).

Pada uji fermentasi manitol menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna pada medium yaitu tetap berwarna hijau, dan pada uji urease menunjukkan hasil negatif karena tidak terjadi perubahan warna media uji yaitu tetap berwarna merah kekuningan. Pada medium cair, tampak terbentuknya pelikel dan sedimen.



Gambar 4.7 Hasil Uji Fisiologis Isolat G3.2

Keterangan gambar: (a)(K): hijau, G3.2(+): kuning, (b)K: hijau, G3.2(+): kuning, (c)K: hijau, G3.2(+): kuning, (d)K: hijau, G3.2(+): kuning, (e)K: hijau, G3.2(-): hijau, (f)K: hijau, G3.2(+): kuning, (g)K: merah kekuningan, G3.2(-): merah kekuningan, (h)Terbentuk pelikel dan sedimen.

Karakter yang dimiliki isolat G3.2 mirip dengan karakter yang dimiliki genus *Candida*. Van-Rij (1987); Kurtzman dan Fell (1998) menyatakan bahwa genus *Candida* termasuk kelompok khamir *imperfecti* yakni, reproduksi seksualnya belum jelas,



merupakan kelompok khamir *anamorphic Ascomycetes* yang tidak menghasilkan askospora atau *non-ascosporogenous yeast*. Dari Gambar 4.6 menunjukkan hasil uji askospora negatif.

Genus *Candida* seringkali membentuk pseudohifa dengan blastospora yang muncul di persimpangan sel pseudohifa yang saling berdekatan. Reproduksi vegetatifnya dengan multilateral *budding*. Selain itu kebanyakan dari spesies *Candida* selalu membentuk pseudohifa maupun hifa (van-Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998), hal ini sesuai dengan karakter yang dimiliki isolat pada Gambar 4.4 yang memperlihatkan adanya bentuk pseudohifa.

*Candida* tidak memiliki pigmen karotenoid (van -Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998), karakter ini mirip dengan isolat W1.1 yang ditunjukkan pada Gambar 4.6 yakni warna koloni isolat tersebut putih. *Candida* memiliki bentuk sel *globose*, *ovoid*, *silindris*, *elongate*, *ogival*, *triangular*, dan *lunate*. Beberapa spesies ada yang mampu memfermentasi gula dan beberapa yang lainnya tidak (van -Rij, 1987; Kurtzman dan Fell, 1998). Bentuk koloni sering kali bundar dengan tepian menyebar maupun penuh, dan elevasi cembung. *Candida* tidak menghasilkan urease, membentuk pelikel di permukaan media dan endapan berwarna putih (Nurhariyati *et al.*, 2004 ).

Genus *Candida* merupakan khamir kosmopolitan (genus paling mendominasi), paling sering terisolasi dari wilayah perairan dan tersebar di laut, sedimen, estuari, maupun berasosiasi dengan alga, ikan, burung, dan mamalia laut. Selain itu *Candida* juga merupakan mikroorganisme asli yang menghuni wilayah laut. Diantara beberapa wilayah tersebut *Candida* paling dominan ditemukan pada bagian sedimen laut (Kutty dan Philip, 2008). Genus *Candida* tidak ditemukan pada laut terbuka, tapi banyak ditemukan di perairan pesisir dan dekat dengan pemukiman penduduk dimana kondisi airnya banyak tercemar limbah domestik (Paula *et al.*, 1983 dalam Saavedra *et al.*, 1995). Selain itu *Candida* juga merupakan khamir pelarut fosfat (Kanti, 2006).



#### 4.4 Kurva Standart Fosfat

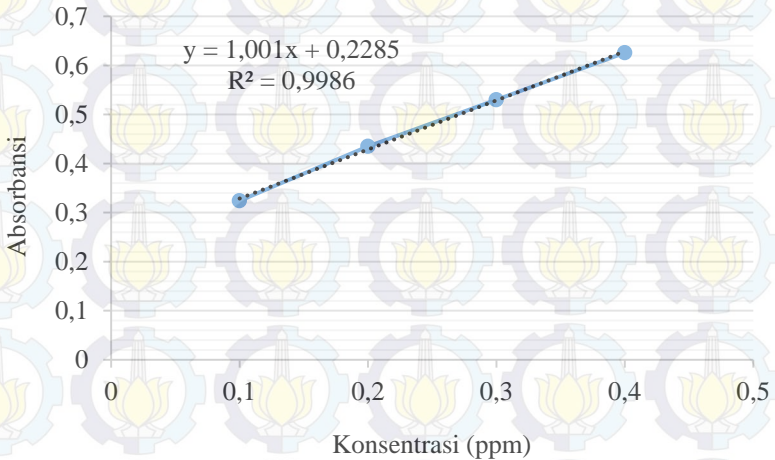
Pembuatan kurva standart fosfat bertujuan untuk mendapatkan persamaan garis yang akan digunakan untuk menentukan kadar fosfat terlarut yang dihasilkan isolat khamir pada perlakuan uji pelarutan fosfat secara kuantitatif. Larutan standart fosfat yang digunakan berasal dari larutan induk fosfat  $\text{H}_3(\text{PO}_4)$  50 ppm yang selanjutnya diencerkan dan dibuat deret larutan larutan standar fosfat dengan konsentrasi 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 ppm. Sedangkan pereaksi fosfat yang digunakan adalah campuran kalium antimonil tartrat, ammonium molibdat, dan asam askorbat. Campuran pereaksi fosfat tersebut membentuk warna biru. Warna biru yang timbul diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 700nm-880nm (Hendrawati *et al.*, 2007). Pengukuran absorbansi pada uji kuantitatif ini menggunakan spektrofotometer UV-VIS dengan panjang gelombang 880 nm.

Sampel setelah ditambahkan dengan larutan campuran yang terdiri dari ammonium molibdat, antimonil tartrat, dan asam askorbat langsung berubah menjadi larutan asam (Alianto *et al.*, 2009). Pada kondisi larutan asam, ammonium molibdat dan antimonil tartrat bereaksi dengan ortofosfat yang terdapat dalam sampel (APHA, 2005 dalam Alianto *et al.*, 2009). Kemudian terjadi pembentukan senyawa kompleks amonium molibdat yang berwarna kuning (Milero, 2006 dalam Alianto *et al.*, 2009).

Keberadaan asam askorbat dalam sampel mereduksi bentuk-bentuk asam ini menjadi senyawa asam fosfomolibdat. Senyawa asam fosfomolibdat direduksi menjadi warna biru yang terbentuk sempurna yang dikenal sebagai molibdenum biru. Dengan keberadaan asam askorbat senyawa kompleks yang berwarna kuning tersebut direduksi menjadi molibdenum biru. Jumlah molibdenum biru yang terbentuk proporsional dengan konsentrasi ortofosfat dalam sampel (Alianto *et al.*, 2009).

Dari kurva standart fosfat akan didapatkan persamaan garis regresi linier  $y = ax + b$ , dimana  $y$  adalah hasil absorbansi larutan standar fosfat,  $x$  adalah konsentrasi larutan standar fosfat,  $a$

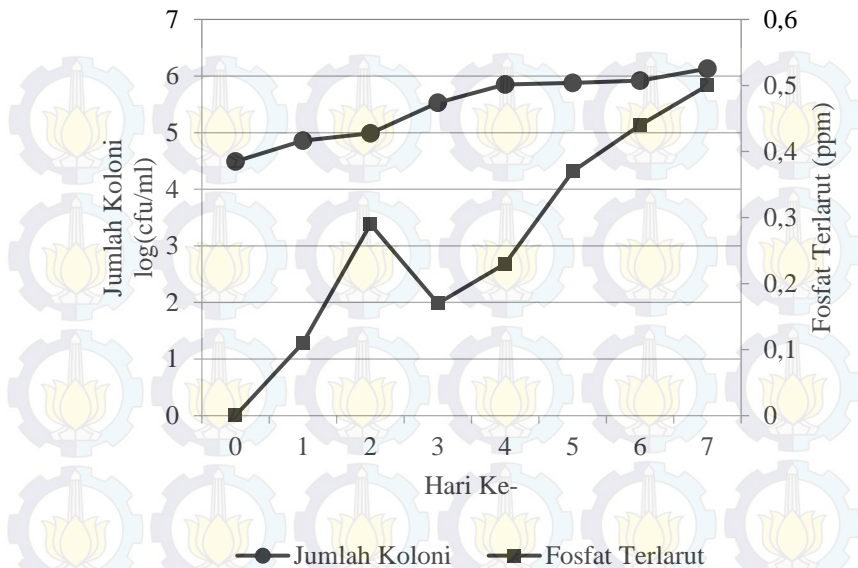
adalah koefisien, dan b adalah konstanta. Dan berdasarkan kurva standart fosfat yang telah dibuat didapatkan persamaan garis  $y = 1,001x + 0,2285$  dan nilai  $R^2 = 0,9986$  (Gambar 4.8) (Lampiran 10).



Gambar 4.8 Kurva Standart Fosfat

#### 4.5 Konsentrasi Fosfat Terlarut yang Dihasilkan Isolat Khamir

Dua isolat khamir terbaik dalam uji kualitatif yaitu *Candida* W1.1 dan *Candida* G3.2 yang kemudian diuji kuantitatif menunjukkan konsentrasi fosfat terlarut yang semakin tinggi seiring dengan semakin lamanya waktu inkubasi (Gambar 4.9 dan 4.10).

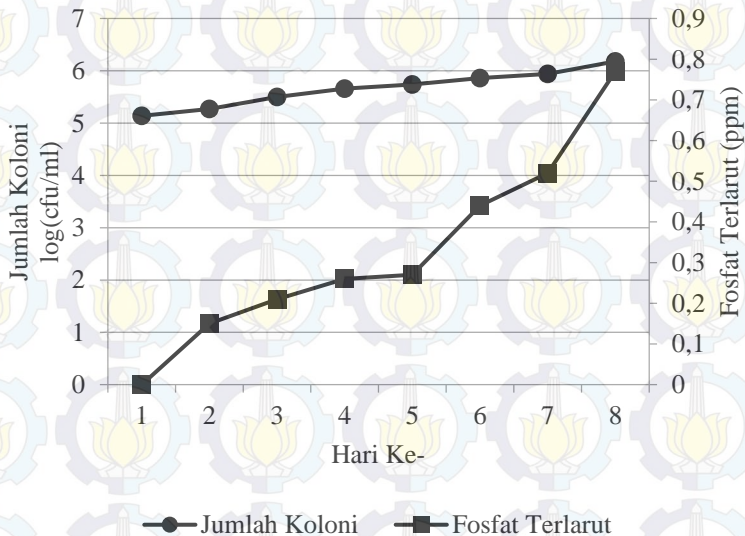


Gambar 4.9 Grafik Fosfat Terlarut dan Kurva Pertumbuhan *Candida* W1.1

Konsentrasi fosfat terlarut *Candida* W1.1 terus mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu inkubasi namun pada hari ketiga waktu inkubasi terjadi penurunan kadar fosfat terlarut sebesar 0,17 ppm, isolat tersebut mengalami penurunan konsentrasi fosfat terlarut jika dibandingkan hari sebelumnya sebesar 0,29 ppm (Lampiran 11). Penurunan konsentrasi fosfat terlarut ini diduga disebabkan oleh adanya pemakaian kembali fosfat terlarut oleh khamir sebagai sumber nutrisi untuk aktivitas metabolismenya. Adanya fosfat terlarut yang tinggi dalam medium digunakan untuk aktivitas respirasi oksidatif yang berperan dalam transfer atau konsumsi glukosa ke dalam sel untuk pembentukan ATP dan biomassa sehingga akan meningkatkan pertumbuhan (Raharjo *et al.*, 2007). Fosfor juga termasuk dalam komposisi fosfolipid yang merupakan unsur penting sel khamir dan asam nukleat (Hawker, 1950 dalam

Raharjo *et al.*, 2007). Selain mengasimilasi fosfat yang dibebaskannya, isolat khamir juga menghasilkan sejumlah besar fosfat tersedia sebagai kelebihan dari pasokan nutrisinya ke dalam medium Pikovskaya cair yang dihitung sebagai konsentrasi fosfat terlarut. Kadar fosfat terlarut yang dihasilkan *Candida* W1.1 hingga akhir waktu inkubasi sebesar 0,50 ppm.

Peningkatan kadar fosfat terlarut sesuai waktu inkubasi diikuti dengan pertambahan jumlah koloni khamir (Lampiran 12). Bila dihubungkan dengan kurva pertumbuhan, terlihat bahwa jumlah koloni juga mengalami peningkatan seiring waktu inkubasi. Keadaan ini dikarenakan khamir memasuki fase log. Pada fase ini khamir membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini pertumbuhan populasi khamir masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak dari pada jumlah sel yang mati (Fardias, 1988).



Gambar 4.10 Grafik Fosfat Terlarut dan Kurva Pertumbuhan *Candida* G3.2



Konsentrasi fosfat terlarut *Candida* G3.2 terus mengalami peningkatan seiring dengan lamanya waktu inkubasi. Kadar fosfat terlarut yang dihasilkan *Candida* G3.2 hingga akhir waktu inkubasi sebesar 0,77 ppm. Peningkatan kadar fosfat terlarut tersebut diikuti dengan pertambahan jumlah koloni isolat khamir yang terus meningkat hingga akhir waktu inkubasi. Bila dihubungkan dengan kurva pertumbuhan, terlihat bahwa jumlah koloni juga mengalami peningkatan seiring waktu inkubasi. Keadaan ini dikarenakan khamir memasuki fase log. Pada fase ini khamir membelah dengan cepat dan konstan mengikuti kurva logaritmik. Pada fase ini pertumbuhan populasi khamir masih naik karena jumlah sel yang tumbuh masih lebih banyak dari pada jumlah sel yang mati (Fardias, 1988).

Konsentrasi fosfat terlarut paling tinggi dihasilkan oleh *Candida* G3.2 sebesar 0,77 ppm pada akhir masa inkubasi sedangkan *Candida* W1.1 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 0,50 ppm. *Candida* W1.1 pada akhir masa inkubasi menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut yang relatif lebih kecil dibandingkan dengan *Candida* G3.2 hal tersebut berbeda dengan hasil uji kualitatif pada media Pikovskaya padat yang menunjukkan nilai IPF *Candida* W1.1 lebih besar dibandingkan *Candida* G3.2. Aktivitas masing-masing isolat pelarut fosfat yang tumbuh pada medium padat berbeda dengan aktivitas pada medium cair. Kemampuan isolat pada medium cair dapat dipengaruhi oleh aerasi dan lamanya waktu inkubasi (Lestari *et al.*, 2011). Perbedaan tipe medium dari medium padat ke medium cair juga dapat mempengaruhi pertumbuhan dan viabilitas, meskipun medium yang digunakan adalah sama. Pada medium padat, pertumbuhannya berupa pertumbuhan yang melekat pada permukaan medium (*attached growth*), sedangkan pada medium cair tipe pertumbuhannya akan menyerupai suspensi larut (*suspended growth*) (Li C, 2007 dalam Hidayah dan Shovitri, 2012). Aktivitas dalam melarutkan fosfat pada media padat dan cair tidak mutlak sama (Fankem *et al.*, 2006 dalam Lestari *et al.*, 2011).

Selain fosfat terlarut yang dimanfaatkan oleh sel khamir glukosa yang terdapat di dalam medium juga menjadi nutrisi yang sangat penting. Glukosa merupakan bentuk molekul karbohidrat yang paling sederhana yang terdiri dari satu molekul gula sederhana yang disebut monosakarida. Glukosa terdiri atas beberapa atom C (Lehninger, 2004). Sel sel khamir menggunakan karbon dari glukosa untuk mendapatkan energi dan membangun tubuhnya, sehingga jumlah koloni khamir akan semakin meningkat.

Khamir termasuk kelompok mikroorganisme yang mampu memproduksi asam organik (khususnya sitrat) (Vassileva *et al.*, 2000 dalam Hesham *et al.*, 2011). Berdasarkan hasil identifikasi kedua isolat tersebut termasuk dalam genus *Candida*. Kemampuan *Candida* melarutkan fosfat mungkin disebabkan oleh kemampuannya melakukan fermentasi glukosa menjadi beberapa asam organik seperti asam laktat, asam sitrat, dan glukonat (Huang *et al.*, 2003 dalam Kanti, 2006). Hal ini diperkuat dari hasil uji fermentasi glukosa yang menunjukkan bahwa *Candida* W1.1 mampu memfermentasi glukosa, maltosa, laktosa, galaktosa dan *Candida* G3.2 mampu memfermentasi glukosa, maltosa, laktosa, galaktosa, sorbitol. Dan keduanya mampu menghasilkan asam organik.

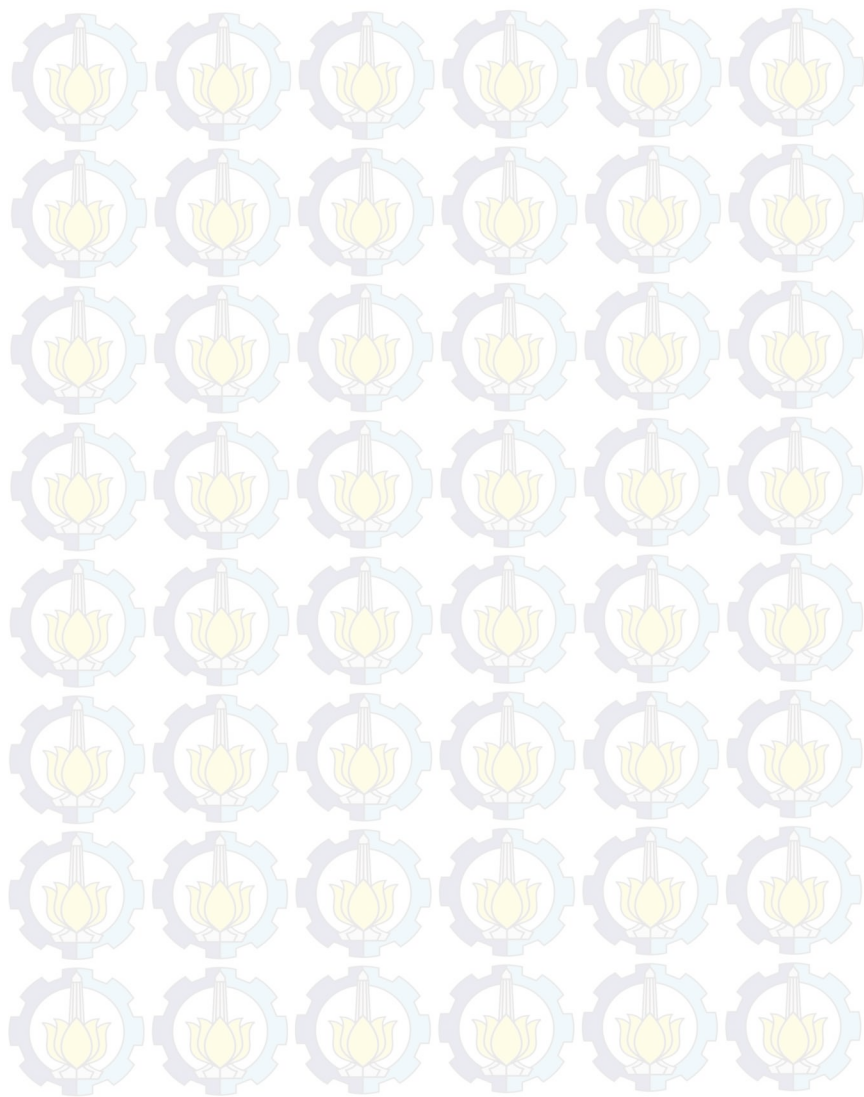
Akibat pembentukan asam organik tersebut terjadi penurunan pH medium dan penurunan pH ini mengakibatkan kestabilan kelarutan  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , berubah lebih kepada pembentukan orthofosfat (Kanti, 2006). Selain karena penurunan pH, adanya kecenderungan  $\text{Ca}^{2+}$  untuk membentuk khelat (kompleks yang stabil) dengan asam-asam organik juga menyebabkan terjadinya pembebasan P menjadi larut (Raharjo *et al.*, 2007).

Asam-asam organik sangat berperan dalam pelarutan fosfat karena asam organik tersebut relatif kaya akan gugus-gugus fungsional karboksil ( $-\text{COO}^-$ ) dan hidroksil ( $-\text{OH}$ ) yang bermuatan negatif sehingga memungkinkan untuk membentuk senyawa

komplek dengan ion (kation) logam yang biasa disebut khelat (Santosa, 2007 *dalam* Saraswati *et al.*, 2007)

Berdasarkan hasil penelitian isolat khamir dapat merubah fosfat tidak larut menjadi bentuk fosfat yang terlarut melalui pembentukan asam organik yang akhirnya membebaskan fosfat terikat dan menjadi fosfat tersedia bagi tanaman, karena fosfat merupakan unsur hara makro esensial yang sangat dibutuhkan untuk pertumbuhan dan perkembangan tanaman. Di dalam tanah kebanyakan fosfat berikatan dengan mineral (Ca) serta logam seperti Fe dan Al. Isolat khamir pelarut fosfat dapat dimanfaatkan sebagai agensi *biofertilizer* untuk meningkatkan fosfat terlarut di dalam tanah yang sangat dibutuhkan oleh tanaman.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**





## **BAB V**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **5.1 Kesimpulan**

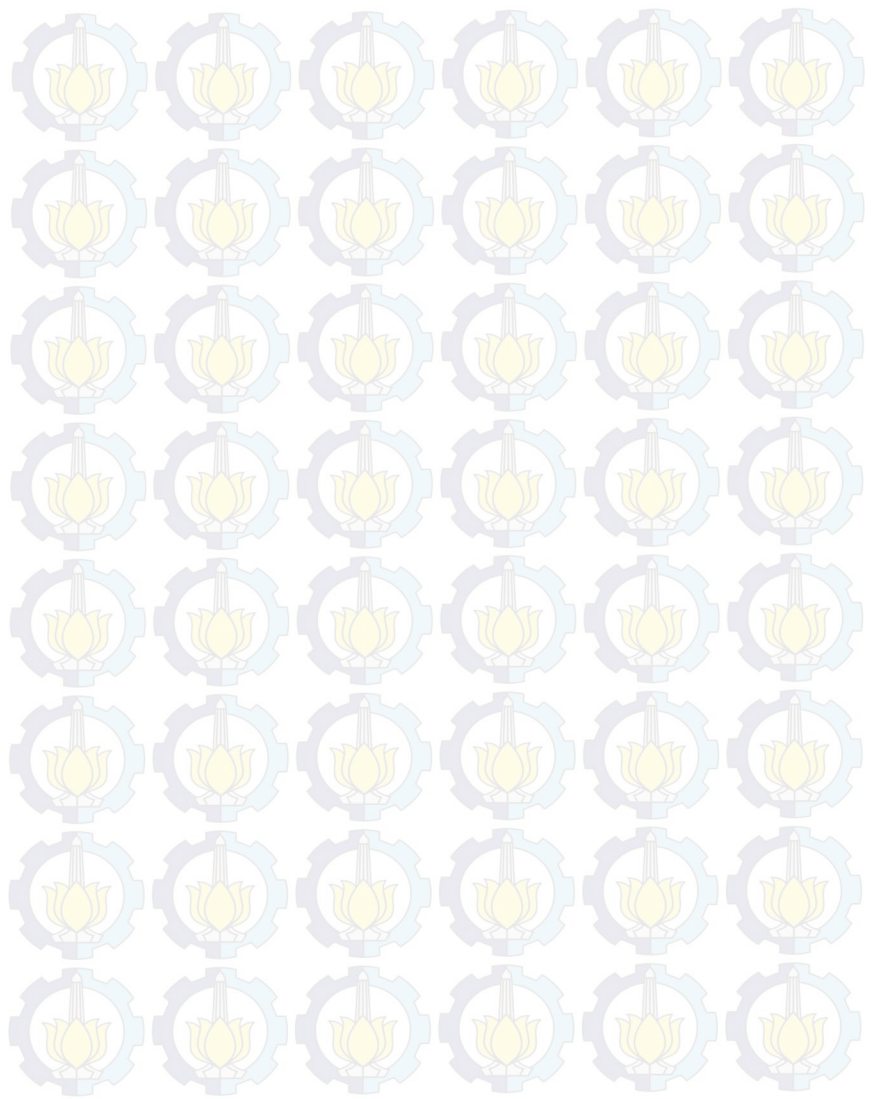
Kesimpulan dari penelitian Khamir dari Kawasan Mangrove Pantai Timur Surabaya sebagai Pelarut Fosfat adalah

1. Indeks Pelarutan Fosfat terbaik adalah sebesar 1,18 dan 1,15 yang masing-masing dimiliki oleh isolat khamir dengan kode W1.1 dan G3.2
2. Khamir dengan kode W1.1 dan G3.2 memiliki potensi terbaik sebagai pelarut fosfat diduga termasuk ke dalam genus *Candida*.
3. *Candida* W1.1 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 0,50 ppm pada hari ke-7 dan *Candida* G3.2 menghasilkan konsentrasi fosfat terlarut sebesar 0,77 ppm pada hari ke-7.

#### **5.2 Saran**

1. Pada proses identifikasi khamir masih dilakukan secara konvensional dengan mengamati karakteristik fenotipiknya, maka untuk selanjutnya perlu dilakukan identifikasi dengan melihat karakteristik genotipiknya.
2. Perlu penelitian lebih lanjut mengenai optimasi faktor-faktor lingkungan yang mempengaruhi aktivitas pelarutan fosfat oleh khamir.

**“Halaman ini sengaja dikosongkan”**



## DAFTAR PUSTAKA

Anonim. 2014. **Observing Fungi in a Petri Dish**. <<http://www.microbiologyonline.org.uk/teachers/observing-microbes/observing-fungi-in-a-Petri-dish>> [15 Februari 2015]

Alam, S., Khalil, S., Ayub, N., dan Rashid, M. 2002. *In vitro* Solubilization of Inorganic Phosphate by Phosphate Solubilizing Microorganisms (PSM) from Maize Rhizosphere. **International Journal of Agriculture & Biology** 4(4): 454-458.

Alexander, M. 1977. **Introduction to Soil Mycrobiology** 2<sup>nd</sup> Edition. New York: John Wiley and Sons.

Alianto, Adiwilaga, E.M., Damar, A., dan Harris, E. 2009. Measurement of Dissolved Inorganic Nutrient In Euphotic Zone The Banten Bay. **Indo. J. Chem** 9(2) 217-225.

Arisandi, P. 2001. **Biomonitoring Parsipatif – Alternatif Pemantauan Kualitas Air Kali Surabaya**. <<http://www.ecoton.or.id/>> [5 Maret 2015]

Bajpai, P. D. dan Rao, W. V. B. S. 2012. Extracellular Production of Organic Acids by Selected Bacteria Solubilising Insoluble Phosphate. **Phosphate Solubilising Bacteria, Soil Science and Plant Nutrition** 17(2): 44-45.

Barosso, C.B., Pereira, G.T., dan Nahas, E. 2006. Solubilization of  $\text{CaHPO}_4$  And  $\text{AlPO}_4$  by *Aspergillus niger* in Culture Media with Different Carbon and Nitrogen Sources. **Brazilian Journal of Microbiology** 37: 434-438.

Boekhout, T. dan Robert, V. 2003. **Yeast In Food: Beneficial and Detrimental Aspects**. Boca Raton: CRC Press.

Chen, Y.P., Rekha, P.D., Arun, A.B., Shen F.T., Lai, W.A., dan Young, C.C. 2006. Phosphate Solubilizing Bacteria from Subtropical Soil and Their Tricalcium Phosphate Solubilizing Abilities. **Applied Soil Ecology** 34(1): 33-41.

Clescerl, L.S., Greenberg, A.E., dan Eaton, A.D. 1999. **Standard Methods for Examination of Water & Wastewater 20<sup>th</sup> Edition**. Washington, D.C: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.

Dawes, I.W dan Sutherland, I.W. 1976. **Microbial Physiology**. New York: John Wiley and Sons.

Ernanda, D.A. 2003. Seleksi Isolat Khamir Tanah Pelarut Fosfat dari Tanah Gunung Halimun, Jawa Barat. **Skripsi**. Bogor: Program Studi Kimia S1, Institut Pertanian Bogor.

Fardiaz, S. 1988. **Fisiologi Fermentasi**. Bogor: PAU IPB

Fardiaz, S. 1992. **Mikrobiologi Pangan I**. Jakarta: Gramedia.

Ghazali, I. 2015. Pemanfaatan Mangrove Berbasis Kearifan Lokal di Pantai Timur Surabaya. **Tesis**. Bogor: Program Studi Pengelolaan Sumberdaya Pesisir dan Lautan, Institut Pertanian Bogor.

Ginting, R.C.B., Saraswati, R., dan Husen, E. 2006. **Pupuk Organik dan Pupuk Hayati: Mikroorganisme Pelarut Fosfat**. Jakarta: Balai Besar Litbang Sumber Daya Lahan Pertanian Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian.

Harley, J.P. dan Prescott, L.M. 2002. **Laboratory Exercises in Microbiology 5<sup>th</sup> Edition**. U.S.A: McGraw-Hill Publishers.



Hawusiwa, E.S., Wardani, A.K., dan Ningtyas, D.W. 2015. Pengaruh Konsentrasi Pasta Singkong (*Manihot esculenta*) dan Lama Fermentasi pada Proses Pembuatan Minuman Wine Singkong. **Jurnal Pangan dan Agroindustri** 3(1): 147-155.

Hendrawati, Prihadi, T.H., dan Rohmah, N.N. 2007. Analisis Kadar Phosfat dan N-Nitrogen (Amonia, Nitrat, Nitrit) pada Tambak Air Payau akibat Rembesan Lumpur Lapindo di Sidoarjo, Jawa Timur. **Badan Riset Kelautan dan Perikanan, Pasar Minggu Jakarta Selatan** 135-143

Hesham, A.E dan Hashem., M. M. 2011. Molecular Genetic Identification of Yeast Strains Isolated from Egyptian Soils for Solubilization of Inorganic Phosphates and Growth Promotion of Corn Plants. **Microbiol. Biotechnol** 21(1): 55-61.

Hidayah, N., dan Shovitri, M. 2012. Adaptasi Isolat Bakteri Aerob Penghasil Gas Hidrogen pada Medium Limbah Organik. **Jurnal Sains dan Seni ITS** 1: 16-18.

Jena, S.K. dan Rath, C.C. 2013. Optimization of Culture Conditions of Phosphate Solubilizing Activity of Bacterial sp. Isolated from Similipal Biosphere Reserve in Solid-State Cultivation by Response Surface Methodology. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences** 2(5): 47-59.

Jones, U.S. 1982. **Fertilizers and Soil Fertility 2<sup>nd</sup> Edition**. Reston: Reston Publ. Co.

Jumiyati, Bintari, S.H., Mubarak, I. 2012. Isolasi dan Identifikasi Khamir secara Morfologi di Tanah Kebun Wisata Pendidikan Universitas Negeri Semarang. **Biosantifika** 4(1): 27-35.

Kanti, A. 2004. Identifikasi Jenis Khamir yang Diisolasi dari Tanah Gambut Taman Nasional Bukit Duabelas, Jambi. **BioSMART** 6(1): 10-14.

Kanti, A. 2005. Khamir Pelarut Fosfat yang Diisolasi dari Tanah Taman Nasional Gunung Halimun. **Gakuryoku** 11 (2): 156-161.

Kanti, A. 2006. Marga Candida, Khamir Tanah Pelarut Posfat yang Diisolasi dari Tanah Kebun Biologi Wamena, Papua. **Biodiversitas** 7(2): 105-108.

Kenworthy W, Currin CA, Fonseca M and Smith G. 1989. Production, Decomposition and Heterotrophic Utilization of the Seagrass *Halophila decipiens* in a Submarine Canyon. **Mar. Ecol. Prog. Ser** 51: 277- 290.

Khan, A. A., Jilani, G., Akhtar, M. S., Naqvi, S. M. S., dan Rasheed, M. 2009. Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. **Journal Agriculture Biol. Sci.** 1(1): 48-58.

Khiari, L., dan Parent, L.E. 2005. Phosphorus Transformation in Acid t – Textured Soils Treated with Dry Swine Manure. **Canadian Journal of Soil Science** 85: 75-87.

Kim, K. Y., McDonald, G. A., dan Jordan, D. 1997. Solubilization of Hydroxyapatite by Enterobacter Agglomerans and Cloned *Escherichia coli* in Culture Medium. **Biol. Fertil. Soils** 24: 347-352.

Kurtzman, C.P. dan Fell, J.W. 1998. **The Yeast: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier Science B.V

Kutty, S. N. dan Philip, R. 2008. Marine yeasts - a Review. **Yeast** 25: 465–483.

Lehninger, A.L., M. M. Cox, dan D. L. Nelson. 2004. **Lehninger Principles of Biochemistry, Fourth Edition**. USA: W.H. Freeman dan Co.

Lestari, W., Linda, T.M., dan Martina, A. 2011. Capability of Phosphate Solubilizing Bacteria from Sei Garo in Soluble Phosphate and its Uptake by Soybean. **Biospecies** 4(2): 1-5.

Mahdi, S.S., Hassan, G.I., Hussain, A., dan Faisul-ur-Rasool. 2011. Phosphorus Availability Issue- Its Fixation and Role of Phosphate Solubilizing Bacteria in Phosphate Solubilization. **Research Journal of Agricultural Sciences** 2(1): 174-179.

Meyers, S.P., Ahearn, D.G, Grunkel, W., Roth, F.J Jr. 1967. Yeast from the North Sea. **Marine Biology** 1: 118-123.

Mukri, E.S.A., Shaari, A.R., dan Rahman, K.H.A. 2014. Characterization of Potential Phosphate Solubilizing Bacteria from the Local Paddy Fields in Perlis. **Advances in Environmental Biology** 56-81.

Nakayan, P., Shen F.T., Hung M.H., Young C.C. 2009. Effectiveness of *Pichia* sp. CC1 in Decreasing Chemical Fertilization Requirements of Garden Lettuce in Pot Experiments. **As. J. Food. Ag-Ind. Special**. S66-S68.

Narsian, V., Samaha, A.A.S. M., Patel, H.H. 2010. Rock Phosphate Dissolution by Specific Yeast. **Indian J Microbiol** 50: 57-62.

Nurhariyati, T., Ni'matuzzahroh., dan Surtiningsih, T. 2004. Keanekaragaman Khamir Pendegradasi Minyak Hasil Isolasi Minyak dari Pelabuhan Tanjung Perak Surabaya. **Berk. Penelitian Hayati** 9: 87-91.

Pelczar Jr, M.J dan Pelczar M.F.. 1986. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Jakarta: UI Press.

Raharjo, B., Suprihadi, A., dan Agustina, D.K. 2007. Pelarutan Fosfat Anorganik oleh Kultur Campur Jamur Pelarut Fosfat Secara *In Vitro*. **Jurnal Sains & Matematika (JSM)** 15(2): 45-54.

Rao, N. S. 1994. **Biofertilizeres in Agriculture and Forestry 3rd Edition**. New Delhi: Oxford and IBH Publishing.

Rodriguez, H. dan Fraga, R. 1999. Phosphate Solubilizing Bacteria and their Role in Plant Growth Promotion. **Biotechnology Advances** 17: 319-339.

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., dan Bashan, Y. 2006. Genetics of Phosphate Solubilization and its Potential Applications for Improving Plant Growth-Promoting Bacteria. **Plant and Soil** 287: 15-21.

Rosmarkam, A. dan Yuwono, N. W. 2002. **Ilmu Kesuburan Tanah**. Yogyakarta: Kanisius.

Saraswati, R., Husen, E. dan Simanungkalit, R.D.M. 2007. **Metode Analisis Biologi Tanah**. Bogor: Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Sumberdaya Lahan Pertanian.

Saavedra, N.Y.H., D.H. Saavedra, dan J.L. Ochoa. 1995. Factors Affecting the Distribution of the Genus *Candida* (Berkhout) Along the West Coast of Baja California Sur, Mexico. **Appl. Microbiol** 18: 109-112.

Schinner, F., Oninger, R., Kandeler, E. dan Margesin, R. 1996. **Methods in Soil Biology**. Jerman: Springer-Verlag.



Soepardi, G. 1983. **Sifat dan Ciri Tanah**. Bogor: Institut Pertanian Bogor.

Son, H., Park, G., Cha, M., Hoe, M., 2006. Solubilization of Insoluble Phosphate by a Novel Salt and Ph Tolerant Bacteria Isolated from Soybean Rhizosphere. **Bioresource Technology** 97: 204-210.

Suliasih, R. 2006. Aktivitas Fosfatase dan Pelarutan Kalsium Fosfat oleh Beberapa Bakteri Pelarut Fosfat. **Jurnal Biodiversitas** 1: 23-26.

Sumarsih, S., 2003. **Mikrobiologi Dasar**. Universitas Pembangunan Nasional Veteran, Yogyakarta.

Sutedjo dan Mulyani, M. 1996. **Mikrobiologi Tanah**. Jakarta: Rineka Cipta.

Thatoi, H., Behera, B.C., Dangar, T.K., dan Mishra, R.R. 2012. Microbial Biodiversity in Mangrove Soils of Bhitarkanika, Odisha, India. **International Journal of Environmental Biology** 2(2): 50-58

Tisdale, S.L., Nelson, W.L., dan Beaton, J.D. 1985. **Soil Fertility and Fertilizer 4<sup>th</sup> Edition**. New York: MacMillan.

Vance, C.P., Stone, C.U., dan Allan, D.L. 2003. Phosphorus Acquisition and Use: Critical Adaptations by Plants for Securing a Nonrenewable Resource. **New Phytologist** 157: 423-447.

Van-Rijj, K. 1987. **The Yeasts: A Taxonomic Study**. Amsterdam: Elsevier Science.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M., dan Vassilev, N. 1998. Application of an Encapsulated Filamentous Fungus in Solubilization of Inorganic Phosphates. **Biotechnology** 63: 67-72.

Vassileva, M., Azcon, R., Barea, J.M., dan Vassilev, N. 2000. Rock Phosphate Solubilization by Free and Encapsulated Cells of *Yarrowia lipolytica*. **Process Biochem** 35: 693-697.

Wang, M., Chen, J.K., Li, B. 2007. Characterization of Bacterial Community Structure and Diversity in Rhizosphere Soils of Three Plants in Rapidly Changing Salt Marshes Using 16S rDNA. **Pedosphere** 17(5): 545-556.

Widawati, S dan Muharam, A. 2012. Uji Laboratorium Azospirillum sp. yang Diisolasi dari Beberapa Ekosistem. **J. Hort** 22(3): 258-267.

Widawati, S dan Suliasih. 2005. Populasi Bakteri Pelarut Fosfat (BPF) di Cikaniki, Gunung Batol dan Ciptarasa, serta Kemampuannya Melarutkan P Terikat di Media Pikovskaya Padat. **Biodiversitas** 7 (1): 10-14

Widiastutik, N dan Alami, N.H. 2014. Isolasi dan Identifikasi Yeast dari Rhizosfer *Rhizophora mucronata* Wonorejo. **Jurnal Sains dan Seni POMITS** 3(1): 2337-3520.

Zunaidah, S. dan Alami, N.H. 2014. Isolasi dan Karakterisasi Yeast dari Rhizosphere *Avicennia marina* Wonorejo. **Jurnal Sains dan Seni POMITS** 3(1): 2337-3520.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Pembuatan Medium YMEA (*Yeast Malt Extract Agar*) dan YMB (*Yeast Malt Broth*)

3 g *yeast extract*, 3 g *malt extract*, 5 g pepton, 10 g glukosa, dan 0,5 g *chloramphenicol*

Ditambahkan 20 g agar dicampurkan dengan 1 L akuades untuk membuat YMEA, sedangkan pembuatan YMB tanpa penambahan agar

Dihomogenkan dan dipanaskan hingga mendidih dengan *hot plate magnetic stirrer*

Disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit

## Lampiran 2. Pembuatan Medium Uji Fermentasi Glukosa

1 % glukosa/laktosa/maltosa/galaktosa/manitol/sorbitol w/v, *pepton water* 100 ml, *bromthymol blue* 0,1%, dan kloramfenikol 200 mg dihomogenkan dalam 1 L akuades.



Disterilisasi medium dengan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 1,5 atm selama 15 menit



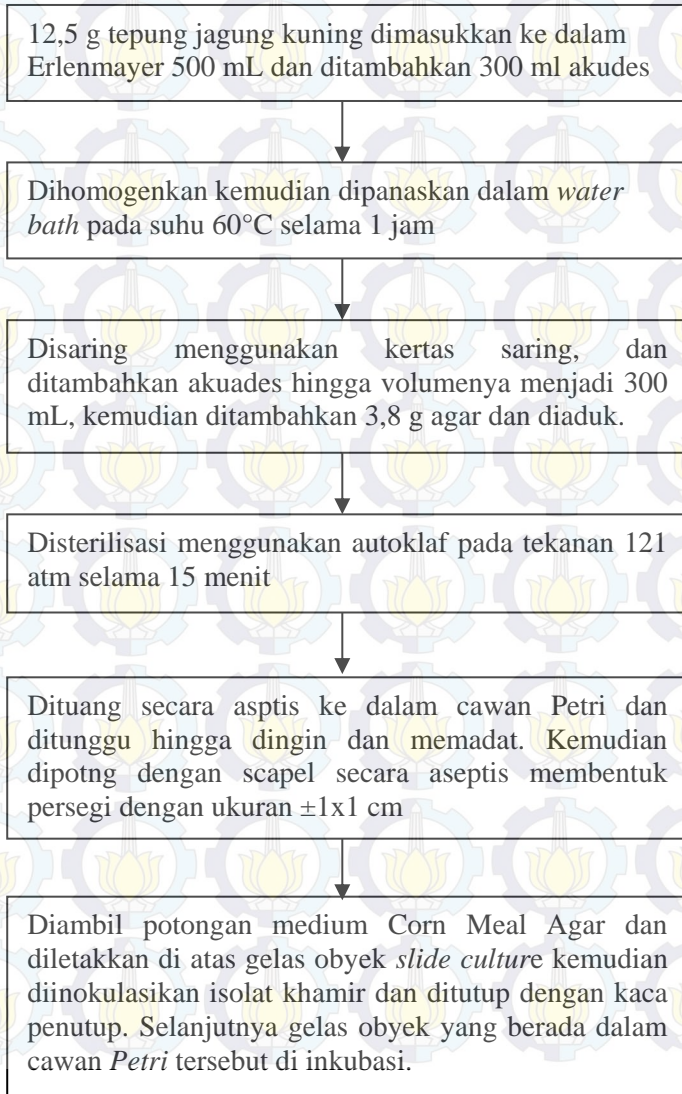
### Lampiran 3. Pembuatan dan Komposisi Medium *Urea Broth*

0,1 g *yeast extract*, 9,1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 9,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 20 g urea, 0,01 g fenol red dan 200 mg kloramfenikol dihomogenkan dalam 1 liter akuades



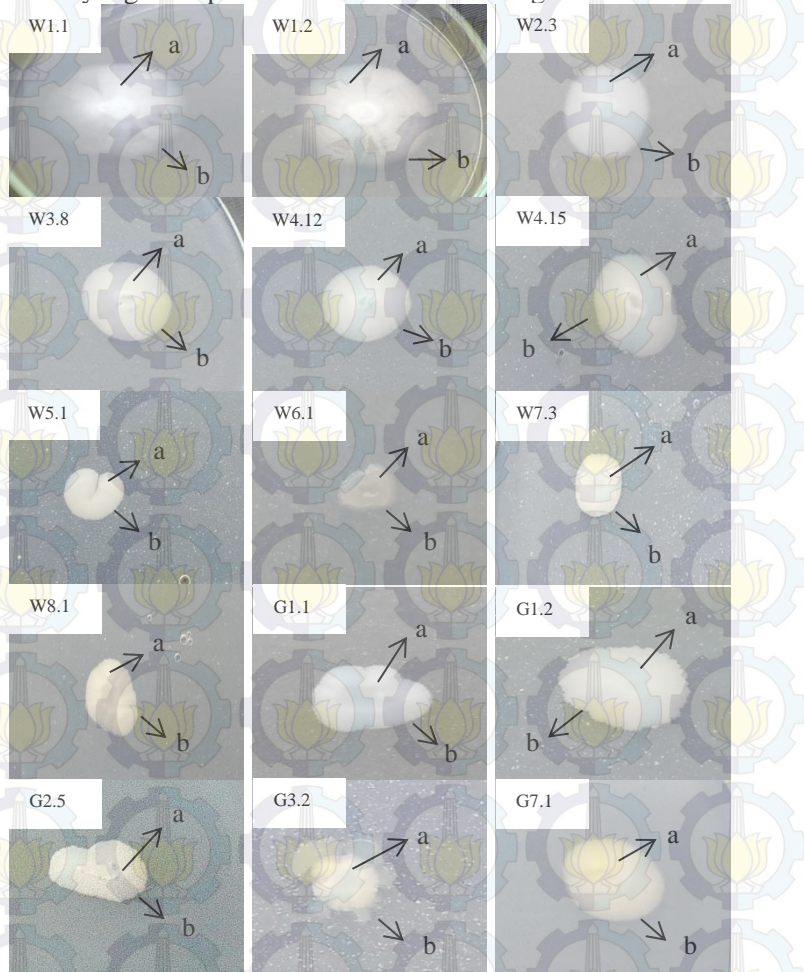
Diatur pH medium menjadi 6,8-7 kemudian diambil 4-5 ml dan dituangkan ke dalam tabung reaksi steril secara aseptis

Lampiran 4. Pembuatan Medium *Corn Meal Agar* dan Metode *Slide Culture*



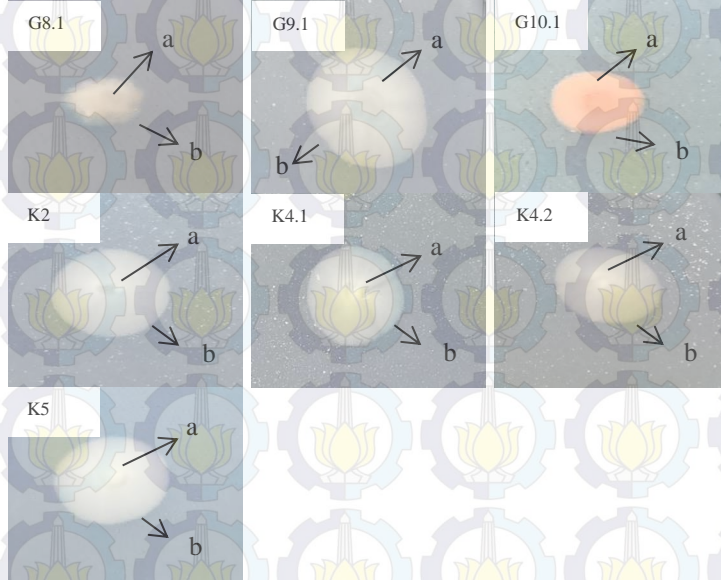
## Lampiran 5 Hasil Uji Kualitatif Isolat Khamir

### Isolat yang Mampu Membentuk Zona Bening



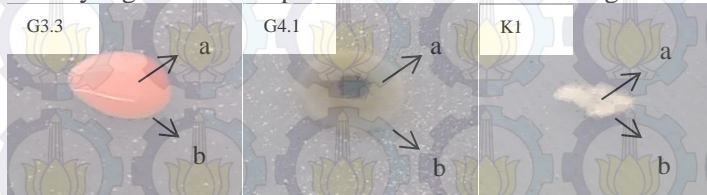
## Lanjutan Lampiran 5. Hasil Uji Kualitatif Isolat Khamir

### Isolat yang Mampu Membentuk Zona Bening



Keterangan gambar: a.Koloni Khamir, b.Zona Bening

### Isolat yang Tidak Mampu Membentuk Zona Bening



Keterangan gambar: a.Koloni Khamir, b.Tidak Terbentuk Zona Bening



**Lampiran 6. Rata-rata Diameter Koloni Khamir**

Isolat	Rata-rata Diameter Koloni Hari Ke- (cm)						
	1	2	3	4	5	6	7
W1.1	0,55	0,90	1,18	1,57	1,97	2,30	2,72
W1.2	0,53	0,86	1,13	1,50	1,90	2,29	2,70
W2.3	0,33	0,47	0,58	0,77	1,03	1,10	1,24
W3.8	0,46	0,58	0,75	0,95	1,06	1,23	1,43
W4.12	0,35	0,51	0,61	0,81	1,00	1,13	1,30
W4.15	0,40	0,51	0,63	0,81	0,98	1,13	1,27
W5.1	0,43	0,53	0,60	0,67	0,70	0,75	0,83
W6.1	0,33	0,43	0,45	0,55	0,58	0,67	0,67
W7.3	0,38	0,47	0,50	0,55	0,65	0,75	0,80
W8.1	0,40	0,50	0,51	0,60	0,65	0,73	0,88
G1.1	0,45	0,53	0,61	0,63	0,70	0,80	0,85
G1.2	0,57	0,68	0,80	0,91	1,03	1,16	1,30
G2.5	0,51	0,61	0,71	0,86	0,93	1,01	1,13
G3.2	0,38	0,43	0,51	0,51	0,68	0,85	0,92
G3.3	0,45	0,50	0,50	0,60	0,63	0,73	0,75
G4.1	0,35	0,38	0,41	0,55	0,68	0,80	0,93
G7.1	0,55	0,65	0,86	0,98	1,11	1,26	1,45
G8.1	0,48	0,53	0,58	0,61	0,66	0,78	0,88
G9.1	0,60	0,73	0,86	0,98	1,11	1,28	1,45
G10.1	0,47	0,63	0,73	0,87	0,97	1,06	1,11
K1	0,00	0,28	0,37	0,37	0,38	0,43	0,47
K2	0,40	0,51	0,71	0,81	1,03	1,18	1,33
K4.1	0,43	0,60	0,70	0,91	1,06	1,20	1,34
K4.2	0,43	0,55	0,45	0,87	1,08	1,20	1,34
K5	0,50	0,57	0,70	0,90	1,01	1,20	1,33

Lampiran 7. Rata-rata Diameter Total Isolasi Khamir

Isolat	Rata-rata Diameter Total Hari Ke- (cm)						
	1	2	3	4	5	6	7
W1.1	0,8	1,18	1,48	1,91	2,33	2,80	3,23
W1.2	0,8	1,05	1,38	1,70	2,08	2,43	2,82
W2.3	0,55	0,67	0,85	0,97	1,06	1,20	1,38
W3.8	0,00	0,00	0,98	1,18	1,26	1,35	1,55
W4.12	0,00	0,00	0,00	0,00	1,1	1,23	1,40
W4.15	0,00	0,00	0,78	1,15	1,18	1,23	1,37
W5.1	0,00	0,00	0,00	0,77	0,81	0,90	0,93
W6.1	0,00	0,00	0,00	0,73	0,73	0,77	0,77
W7.3	0,00	0,00	0,73	0,81	0,83	0,87	0,90
W8.1	0,00	0,00	0,00	0,75	0,77	0,86	0,91
G1.1	0,00	0,65	0,71	0,83	0,83	0,93	0,95
G1.2	0,68	0,78	0,95	1,11	1,20	1,33	1,45
G2.5	0,00	0,00	0,81	0,96	1,05	1,11	1,21
G3.2	0,00	0,00	0,00	0,71	0,81	0,98	1,06
G3.3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G4.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G7.1	0,00	0,75	0,98	1,11	1,21	1,37	1,53
G8.1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,81	0,95	0,98
G9.1	0,83	0,85	1,06	1,13	1,25	1,40	1,55
G10.1	0,63	0,73	0,97	1,03	1,06	1,17	1,22
K1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
K2	0,00	0,58	0,81	1,01	1,15	1,31	1,43
K4.1	0,00	0,70	0,80	1,01	1,17	1,30	1,45
K4.2	0,00	0,65	0,85	1,04	1,18	1,30	1,45
K5	0,00	0,00	0,00	0,00	1,13	1,30	1,43

Lampiran 8. Lebar Zona Bening Isolat Khamir

Isolat	Rata-rata Diameter Total Hari Ke- (cm)						
	1	2	3	4	5	6	7
W1.1	0,25	0,28	0,30	0,34	0,36	0,50	0,51
W1.2	0,27	0,19	0,25	0,20	0,18	0,14	0,12
W2.3	0,22	0,20	0,27	0,20	0,03	0,10	0,14
W3.8	0	0	0,23	0,23	0,20	0,12	0,12
W4.12	0	0	0	0	0,10	0,10	0,10
W4.15	0	0	0,15	0,34	0,20	0,10	0,10
W5.1	0	0	0	0,10	0,11	0,15	0,10
W6.1	0	0	0	0,18	0,15	0,10	0,10
W7.3	0	0	0,23	0,26	0,18	0,12	0,10
W8.1	0	0	0	0,15	0,12	0,13	0,10
G1.1	0	0,12	0,10	0,20	0,13	0,13	0,10
G1.2	0,11	0,10	0,15	0,20	0,17	0,17	0,15
G2.5	0	0	0,10	0,10	0,12	0,10	0,08
G3.2	0	0	0	0,20	0,13	0,13	0,14
G3.3	0	0	0	0	0	0	0
G4.1	0	0	0	0	0	0	0
G7.1	0	0,10	0,12	0,13	0,10	0,11	0,08
G8.1	0	0	0	0	0,15	0,17	0,10
G9.1	0,23	0,12	0,20	0,15	0,14	0,12	0,10
G10.1	0,16	0,10	0,24	0,16	0,09	0,11	0,11
K1	0	0	0	0	0	0	0
K2	0	0,07	0,10	0,20	0,12	0,13	0,10
K4.1	0	0,10	0,10	0,10	0,11	0,10	0,11
K4.2	0	0,10	0,40	0,17	0,10	0,10	0,11
K5	0	0	0	0	0,12	0,10	0,10

## Lampiran 9. Indeks Pelarutan Fosfat Isolat Khamir

IPF isolat W1.1 hari ke-1

$$\text{IPF} = \frac{X1 + X2}{X2}$$

$$= \frac{0,25 + 0,55}{0,55}$$

$$= 1,45$$

Isolat	Hari ke-	Pengukuran			Isolat	Hari ke-	Pengukuran		
		X1	X2	IPF			X1	X2	IPF
W1.1	1	0,25	0,55	1,45	W4.1	1	0	0,35	1,00
	2	0,28	0,90	1,31		2	0	0,51	1,00
	3	0,30	1,18	1,25		3	0	0,61	1,00
	4	0,34	1,57	1,21		4	0	0,81	1,00
	5	0,36	1,97	1,18		5	0,10	1,00	1,10
	6	0,50	2,30	1,21		6	0,10	1,13	1,08
	7	0,51	2,72	1,18		7	0,10	1,30	1,07
W1.2	1	0,27	0,53	1,50	W4.1	1	0	0,40	1,00
	2	0,19	0,86	1,22		2	0	0,51	1,00
	3	0,25	1,13	1,22		3	0,15	0,63	1,23
	4	0,20	1,50	1,13		4	0,34	0,81	1,41
	5	0,18	1,90	1,09		5	0,20	0,98	1,20
	6	0,14	2,29	1,06		6	0,10	1,13	1,08
	7	0,12	2,7	1,04		7	0,10	1,27	1,07
W2.3	1	0,22	0,33	1,66	W5.1	1	0	0,43	1,00
	2	0,20	0,47	1,42		2	0	0,53	1,00
	3	0,27	0,58	1,46		3	0	0,60	1,00
	4	0,20	0,77	1,25		4	0,10	0,67	1,14
	5	0,03	1,03	1,02		5	0,11	0,70	1,15
	6	0,10	1,10	1,09		6	0,15	0,75	1,20
	7	0,14	1,24	1,11		7	0,10	0,83	1,12
W3.8	1	0	0,46	1,00	W6.1	1	0	0,33	1,00
	2	0	0,58	1,00		2	0	0,43	1,00
	3	0,23	0,75	1,30		3	0	0,45	1,00
	4	0,23	0,95	1,24		4	0,18	0,55	1,32
	5	0,20	1,06	1,18		5	0,15	0,58	1,25
	6	0,12	1,23	1,09		6	0,10	0,67	1,14
	7	0,12	1,43	1,08		7	0,10	0,67	1,14

Keterangan gambar: IPF = Indeks Pelarutan Fosfat; X1 = Zona bening (cm); X2 = Diameter koloni (cm).



## Lanjutan Lampiran 9. Indeks Pelarutan Fosfat Isolat Khamir

Isolat	Hari ke-	Pengukuran			Isolat	Hari ke-	Pengukuran		
		X1	X2	IPF			X1	X2	IPF
W7.3	1	0	0,38	1,00	G2.5	1	0	0,51	1,00
	2	0	0,47	1,00		2	0	0,61	1,00
	3	0,23	0,50	1,46		3	0,10	0,71	1,14
	4	0,26	0,55	1,47		4	0,10	0,86	1,11
	5	0,18	0,65	1,27		5	0,12	0,93	1,12
	6	0,12	0,75	1,16		6	0,10	1,01	1,09
	7	0,10	0,80	1,12		7	0,08	1,13	1,07
W8.1	1	0	0,40	1,00	G3.2	1	0	0,38	1,00
	2	0	0,50	1,00		2	0	0,43	1,00
	3	0	0,51	1,00		3	0	0,51	1,00
	4	0,15	0,60	1,25		4	0,20	0,51	1,39
	5	0,12	0,65	1,18		5	0,13	0,68	1,19
	6	0,13	0,73	1,17		6	0,13	0,85	1,15
	7	0,10	0,81	1,12		7	0,14	0,92	1,15
G1.1	1	0	0,45	1,00	G3.3	1	0	0,45	1,00
	2	0,12	0,53	1,22		2	0	0,50	1,00
	3	0,10	0,61	1,16		3	0	0,50	1,00
	4	0,20	0,63	1,31		4	0	0,60	1,00
	5	0,13	0,70	1,18		5	0	0,63	1,00
	6	0,13	0,80	1,16		6	0	0,73	1,00
	7	0,10	0,85	1,11		7	0	0,75	1,00
G1.2	1	0,11	0,57	1,19	G4.1	1	0	0,35	1,00
	2	0,10	0,68	1,14		2	0	0,38	1,00
	3	0,15	0,80	1,18		3	0	0,41	1,00
	4	0,20	0,91	1,21		4	0	0,55	1,00
	5	0,17	1,03	1,16		5	0	0,68	1,00
	6	0,17	1,16	1,14		6	0	0,80	1,00
	7	0,15	1,30	1,11		7	0	0,93	1,00

Lanjutan Lampiran 9. Indeks Pelarutan Fosfat Isolat Khamir

Isolat	Hari ke-	Pengukuran			Isolat	Hari ke-	Pengukuran		
		X1	X2	IPF			X1	X2	IPF
G7.1	1	0	0,55	1,00	K2	1	0	0,40	1,00
	2	0,10	0,65	1,15		2	0,07	0,51	1,13
	3	0,12	0,86	1,13		3	0,10	0,71	1,14
	4	0,13	0,98	1,13		4	0,20	0,81	1,24
	5	0,10	1,11	1,09		5	0,12	1,03	1,11
	6	0,11	1,26	1,08		6	0,13	1,18	1,11
	7	0,08	1,45	1,05		7	0,10	1,33	1,07
G8.1	1	0	0,48	1,00	K4.1	1	0	0,43	1,00
	2	0	0,53	1,00		2	0,10	0,60	1,16
	3	0	0,58	1,00		3	0,10	0,70	1,14
	4	0	0,61	1,00		4	0,10	0,91	1,10
	5	0,15	0,66	1,22		5	0,11	1,06	1,10
	6	0,17	0,78	1,21		6	0,10	1,20	1,08
	7	0,10	0,88	1,11		7	0,11	1,34	1,08
G9.1	1	0,23	0,60	1,38	K4.2	1	0	0,43	1,00
	2	0,12	0,73	1,16		2	0,10	0,55	1,18
	3	0,20	0,86	1,23		3	0,40	0,45	1,88
	4	0,15	0,98	1,15		4	0,17	0,87	1,19
	5	0,14	1,11	1,12		5	0,10	1,08	1,09
	6	0,12	1,28	1,09		6	0,10	1,20	1,08
	7	0,10	1,45	1,06		7	0,11	1,34	1,08
G10.1	1	0,16	0,47	1,34	K5	1	0	0,50	1,00
	2	0,10	0,63	1,15		2	0	0,57	1,00
	3	0,24	0,73	1,32		3	0	0,70	1,00
	4	0,16	0,87	1,18		4	0	0,90	1,00
	5	0,09	0,97	1,09		5	0,12	1,01	1,11
	6	0,11	1,06	1,10		6	0,10	1,20	1,08
	7	0,11	1,11	1,09		7	0,10	1,33	1,07
K1	1	0	0	0					
	2	0	0,28	1,00					
	3	0	0,37	1,00					
	4	0	0,37	1,00					
	5	0	0,38	1,00					
	6	0	0,43	1,00					
	7	0	0,47	1,00					

### Lampiran 10. Nilai Absorbansi Kurva Standart Fosfat

Konsentrasi				Absorbansi	
	0,1			0,324	
	0,2			0,435	
	0,3			0,530	
	0,4			0,626	

### Lampiran 11. Konsentrasi Fosfat Terlarut

Berdasarkan kurva standart fosfat yang telah dibuat didapatkan persamaan garis  $y = 1,001x + 0,2285$  dan nilai  $R^2 = 0,9986$

Konsentrasi fosfat terlarut *Candida* W1.1 hari ke-1

Ulangan 1

$$y = 1,001x + 0,2285$$

$$0,371 = 1,001x + 0,2285$$

$$0,371 - 0,2285 = 1,001x$$

$$0,1425$$

$$x = \frac{0,1425}{1,001}$$

$$x = 0,1423 \text{ ppm}$$

Ulangan 2

$$y = 1,001x + 0,2285$$

$$0,322 = 1,001x + 0,2285$$

$$0,322 - 0,2285 = 1,001x$$

$$0,0935$$

$$x = \frac{0,0935}{1,001}$$

$$x = 0,0934 \text{ ppm}$$

Rata-rata konsentrasi fosfat terlarut *Candida* W1.1 hari ke-1

$$\frac{0,1423 + 0,0934}{2} = 0,11 \text{ ppm}$$

Hari Ke-	W1.1		G3.2		W1.1	G3.2
	Absorbansi				Konsentrasi Fosfat Terlarut (ppm)	
	Ulangan 1	Ulangan 2	Ulangan 1	Ulangan 2		
0	0,169	0,207	0,125	0,141	0	0
1	0,371	0,322	0,378	0,390	0,11	0,15
2	0,395	0,353	0,395	0,487	0,29	0,21
3	0,411	0,394	0,447	0,532	0,17	0,26
4	0,506	0,414	0,489	0,513	0,23	0,27
5	0,606	0,608	0,548	0,795	0,37	0,44
6	0,680	0,673	0,605	0,910	0,44	0,52
7	0,711	0,759	0,658	1,009	0,50	0,77



### Lampiran 12. Jumlah Koloni Isolat Khamir

$$\begin{aligned}\sum_{50} \text{Koloni Hari Ke-0 Ulangan 1} &= \log \text{cfu/ml} \\ &= 50 \cdot 10^{-3} \\ &= \log 50 + 3 \\ &= 4,698\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum_{20} \text{Koloni Hari Ke-0 Ulangan 2} &= \log \text{cfu/ml} \\ &= 20 \cdot 10^{-3} \\ &= \log 20 + 3 \\ &= 4,301\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum \text{Koloni Hari Ke-0} &= \frac{4,69 + 4,30}{2} \\ &= 4,495\end{aligned}$$

#### *Candida W1.1*

Hari Ke-	$\sum$ Koloni		Rata-rata	log(cfu/ml)		Jumlah Koloni
	Ulangan 1	Ulangan 2		Ulangan 1	Ulangan 2	
0	50	20	35	4,69	4,30	4,495
1	69	79	74	4,83	4,89	4,860
2	77	130	103,5	4,88	5,11	4,995
3	335	356	345,5	5,52	5,55	5,535
4	699	736	717,5	5,84	5,86	5,850
5	750	777	763,5	5,87	5,89	5,880
6	846	897	871,5	5,92	5,93	5,925
7	1259	1467	1363	6,10	6,16	6,130

Lanjutan Lampiran 12. Jumlah Koloni Isolat Khamir

Candida G3.2						
Hari Ke-	Σ Koloni		Rata-rata	log(cfu/ml)		Jumlah Koloni
	Ulangan 1	Ulangan 2		Ulangan 1	Ulangan 2	
0	111	181	146	5,04	5,25	5,145
1	176	200	188	5,24	5,30	5,270
2	310	327	318,5	5,49	5,51	5,500
3	447	489	468	5,65	5,68	5,665
4	533	599	566	5,72	5,77	5,745
5	703	785	744	5,84	5,89	5,865
6	901	999	950	5,89	5,99	5,940
7	1405	1695	1550	6,14	6,22	6,180

## BIODATA PENULIS



Penulis memiliki nama lengkap Windasari Putri Septarina. Lahir di Sidoarjo, 18 September 1992. Penulis menempuh pendidikan formal di SD Negeri Waru IV, SMP Negeri 1 Sidoarjo, SMA Negeri 1 Sidoarjo, dan melanjutkan ke jenjang sarjana di Biologi ITS Surabaya. Penulis memiliki ketertarikan dengan pelajaran Biologi sejak tingkat dasar. Kemampuannya di bidang pelajaran Biologi lebih menonjol dibandingkan pelajaran lain. Selama menempuh pendidikan di Biologi ITS Surabaya penulis pernah menjadi asisten praktikum mata kuliah di bidang Botani. Penulis yang akrab disapa Winda ini memiliki hobi *traveling* dan menyukai hal-hal yang berhubungan dengan alam. Ketertarikannya dalam kegiatan *outdoor* membuat penulis sering berpartisipasi dalam berbagai kegiatan di dalam maupun luar kampus yang berhubungan dengan lingkungan salah satunya penulis menjadi ketua pelaksana *Mangrove In Action* 2014 dengan berhasil menanam 1000 buah *mangrove* sebagai upaya pelestarian *mangrove* khususnya di Surabaya. Meskipun minatnya dalam kegiatan lapangan dan ekologi tidak membuat kemampuannya di dalam laboratorium menjadi tidak terampil hal tersebut terbukti dengan bergabungnya penulis dalam Tim *Research Yeast* Laboratorium Mikrobiologi dan Bioteknologi Jurusan Biologi Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya 2014-2015.